Aus der Universitäts-Augenklinik Marburg a. d. Lahn
Direktor: Professor Dr. med. W. Straub

Über Metabolitkonzentrationen in der Hornhaut und im Kammerwasser unter verschiedenen experimentellen Bedingungen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/L.

vorgelegt von
Gisela Venske
aus Beelen

Marburg/Lahn 1972

Fotodruck E. Symon · 355 Marburg/Lahn · Friedrichstr. 3

Aus der Universitäts-Augenklinik Marburg a. d. Lahn
Direktor: Professor Dr. med. W. Straub

Über Metabolitkonzentrationen in der Hornhaut und im Kammerwasser unter verschiedenen experimentellen Bedingungen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg/L.

vorgelegt von
Gisela Venske
aus Beelen

Marburg/Lahn 1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am: 1.8.1972

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. med. H. OEPEN
Referent: Prof. Dr. med. M. REIM
Correferent: Prof. Dr. med. W. STRAUB

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
	1. Der Aufbau der Hornhaut in Verbindung mit ihrer Funktion	1
	2. Der Stoffwechsel der Hornhaut in Verbindung mit ihrer Funktion	3
	3. Das Kammerwasser	6
	4. Kryotherapie und Friereffekte an der Hornhaut	7
II.	Fragestellung	10
III.	Methodik	12
	1. Narkose und Versuchsvorbereitung	12
	2. Operation zur Präparatgewinnung	12
	3. Hornhautepithelgewinnung nach Frierstop	13
	4. Lyophilisation	14
	5. Extraktgewinnung	14
	a) Epithel nach Frierstop	14
	b) Lyophilisiertes Stroma	15
	c) Kammerwasser	16
	6. Metabolitbestimmungen	16
	a) Testmethode	16
	b) Testansätze	18
	7. Versuchsreihen	23
	a) Normale Augen	23
	b) In vivo-Vereisung	23
	c) Endothelabrasio in vivo	24
	d) Druckversuche in vivo	24
	8. Statistische Auswertung	25
	9. Präparatgewichte	26

IV. Ergebnisse 28

1. Metabolitspiegel im Hornhautepithel 28

a) normal 28
b) vereist 29
c) Endothelabrasio 32

2. Metabolitspiegel im Hornhautstroma 33

a) normal 33
b) vereist 34
c) Endothelabrasio 36
d) Druckerhöhung 37

3. Metabolitspiegel im Kammerwasser 37

a) normal 37
b) vereist 38
c) Endothelabrasio 39
d) Druckerhöhung 39

4. Vergleich der Metabolitspiegel in den Kompartimenten 40

a) normal 40
b) vereist 41
c) Endothelabrasio 41
d) Druckerhöhung 42

5. Konzentrationsgradienten bei den einzelnen Versuchsreihen 42

6. Adenosinphosphatverbindungen bei den einzelnen Versuchen 43

Anhang zu Kapitel IV. 45

V. Diskussion 47

VI. Zusammenfassung 54

VII. Methodischer Anhang 56

1. Abkürzungen 56
2. Tabellen der Einzelwerte 57
3. Literaturverzeichnis 68

I. EINLEITUNG

1. Der Aufbau der Hornhaut in Verbindung mit ihrer Funktion

Sklera und Cornea bilden zusammen den äußeren Mantel des Auges, der dem intraokularen Druck widerstehen muß und den Augeninhalt vor mechanischen Verletzungen von außen schützt. Die Cornea ist außerdem noch ein wichtiges Teilstück des optischen Systems des Auges - von der totalen Brechkraft des menschlichen Auges entfallen fast 75 % auf die Brechkraft der Hornhaut. Deshalb ist die Cornea, wie für gute optische Apparate gefordert, gekrümmt und transparent; und ihre Oberfläche, besonders die äußere, ist glatt.
Die Gesamtdicke der normalen menschlichen Cornea beträgt in vivo gemessen etwa o,55 mm (MAURICE und GIARDINI, DONALDSON). Die Hornhaut ist in 5 Schichten aufgebaut, die parallel zu ihrer Oberfläche liegen.

Das Epithel besteht aus 6 - 7 Zellagen beim Menschen, das entspricht ungefähr 10 % der gesamten Corneastärke. Man unterscheidet 3 Zelltypen: Basalzellen, Intermediärzellen und oberflächliche Zellen. Während der mittleren Lebensdauer der Epithelzellen von 3,5 - 7 Tagen (HANNA, OBRIEN) sollen die Basalzellen langsam unter ständiger Änderung ihrer Form und Funktion an die Oberfläche wandern, wo sie dann abgestoßen werden. Die oberflächlichen Zellen haben sehr feine zytoplasmatische Ausstülpungen, die für das Haften des cornealen Flüssigkeitsfilms von Bedeutung sind (AONO, PEDLER), wodurch die Oberfläche glatt gehalten wird (MAURICE). Neben der Abdichtungs- und Schutzfunktion ist das Epithel für den Energiestoffwechsel der Hornhaut wichtig, wie histochemische und elektronenmikroskopische Befunde zeigen: Das Zytoplasma ist arm an Zellorganellen; die wenigen Mitochondrien sind klein und besitzen spärliche Christae (KAYE und PAPAS, TENG). Man sieht ein deutliches endoplasmatisches Retikulum mit Ribosomen, auch der Golgi-Apparat ist gut

entwickelt (PAYRAU et al.). Das Epithel hat eine eigene ihm zugehörige Basalmembran, die sich innen aus Retikulinfasern und außen aus einer osmiophilen Schicht aufbaut (TENG); sie sichert sein Haftenbleiben.

Die Bowmansche Membran ist eine modifizierte Stromaschicht, die zellfrei ist und sich histochemisch kaum vom übrigen Stroma unterscheidet.

Das Hornhautstroma besteht beim Menschen aus mindestens 1oo Lamellen mit je 5μ Dicke (NAYLOR), die sich aus gebündelten Kollagenfibrillen aufbauen. Die Lamellen laufen von Limbus zu Limbus und kreuzen sich schichtweise unter verschiedenen Winkeln mit sehr regelmäßiger Faserarchitektur (ROHEN). Die Fibrillen sind in einer Kittsubstanz eingebettet, die sich aus Mukopolysacchariden, Protein, Salzen und Wasser (75 %) zusammensetzt. Da sich bei Hornhautschwellung die elektronenmikroskopische Struktur und die Dicke der Fibrillen nicht ändert, scheint es, daß die Quellung in der Grundsubstanz, die die Fibrillen umgibt, stattfindet (SCHWARZ). Die Mukopolysaccharide sollen einmal den Abstand zwischen den Fibrillen konstant halten und außerdem gleichen sie die Lichtbrechung des interfibrillären Raums der des Kollagens an (DAVSON). Sie spielen also für die Transparenz der Cornea eine große Rolle, wie aus der Trübung ersichtlich wird, die bei der Schwellung des Stromas um 5 - 1o % eintritt. Die fortsatzreichen Stromazellen sind modifizierte Fibroblasten und liegen in und hauptsächlich zwischen den Lamellen (GOLDMAN et al.). Wahrscheinlich synthetisieren sie die Fibrillen des Stromas (JAKUS, ROHEN). Die Keratozyten sind zytoplasmaarm und haben nur wenige Zellorganellen; sie machen etwa 2 - 3 % des Gewebsvolumens des Stromas aus (OTORI, GOLDMAN). Im Stromagewebe wurden außerdem einzelne polymorphkernige Leukozyten gefunden (VIRCHOW).

Nach innen ist das Stroma durch die Descemetsche Membran abgeschlossen. JAKUS deutet sie als eine hypertrophierte Basalmembran des Endothels, die stark lichtbrechend, elastisch und äußerst widerstandsfähig ist.

Das Endothel schließt als dünne einzellige Schicht die Cornea gegen das Kammerwasser ab. Die polygonalen Zellen sind seitlich ineinander verzahnt (JAKUS, STAUBESAND), besitzen viele Mitochondrien, ein ausgeprägtes Endoplasmatisches Retikulum und pinozytotische Vesikel; ihre Lebensdauer wird von SALLMANN mit 12o Tagen angegeben. Da die Endothelzellen und ihr Verband eine wichtige Aufgabe im Wassertransport innehaben, und damit die Transparenz der Cornea mitbestimmen, lassen die pinozytotischen Bläschen auf einen transzellulären Transport schließen. Für die Diffusionsvorgänge zwischen Kammerwasser und Stroma sind außerdem die interzellulären Spalten von Bedeutung; ihr Durchmesser variiert auf der Kammerseite zwischen 1oo und 2ooo Å (DONN et al.).

2. Der Stoffwechsel der Hornhaut in Verbindung mit ihrer Funktion

Die Aufrechterhaltung der Struktur der Cornea und damit ihrer Transparenz erfordert eine dauernde Aktivität ihres Stoffwechsels; sie ist von der Energie der Metaboliten abhängig. Da Quellung und Trübung der Hornhaut erst auftreten, wenn der energieliefernde Stoffwechsel gestört ist, scheinen für eine Anzahl von Hornhauterkrankungen Kenntnisse ihrer Stoffwechselvorgänge von Bedeutung zu sein. Die Frage der Ernährung der Cornea ist infolge der fehlenden Durchblutung problematisch. Allerdings lassen sich heute durch die Anwendung moderner Untersuchungsverfahren, wie z. B. des enzymatisch-optischen Tests (WARBURG, BÜCHER) Stoffwechselreaktionen durch die Analyse von beteiligten Metaboliten und Enzymen auch in diesem Gewebe besser erforschen.

Die Zufuhr der Nährstoffe kann für die Cornea über drei Wege erfolgen: Über die Tränenflüssigkeit, über das Kammerwasser und über das Kapillarschlingensystem des Limbus. Dabei sind natürlich die Glucose- und Sauerstoffkonzentrationen in den einzelnen Flüssigkeiten von größtem Interesse für die Energieversorgung. Nach MAURICE ist die perilimbale Versorgung von der Blutbahn her zu vernachlässigen, da sie nur Randgebiete der Hornhaut erreicht. In der Tränenflüssigkeit ist nach Versuchen von GIARDINI und ROBERTS, REIM et al. die Glucosekonzentration sehr niedrig, so daß die Cornea praktisch keine Glucose auf diesem Wege erhalten kann. Damit bleibt das Kammerwasser als einziger Weg für die Glucoseversorgung der zentralen Hornhaut übrig (MAURICE, DAVSON). Mit Hilfe von Metabolitbestimmungen des Glucoseabbauweges und der entsprechenden Enzymbestimmungen hat man in den verschiedenen Schichten der Cornea die Stoffwechselwege verfolgt. Die Ergebnisse führten zur Annahme folgender Theorie für die Ernährung und den Stoffwechsel: Das Stroma wird von den beiden umgebenden Geweben aktiv oder passiv mit den notwendigen Metaboliten versorgt. Aus dem Kammerwasser gelangen die Metabolite durch das Endothel in die Cornea, während das Epithel selbst Energie in Form von Glycogen deponiert (HERRMANN und HICKMAN, TURSS).

Die Rolle des Endothels bei der Glucoseversorgung der Cornea aus dem Kammerwasser ist noch nicht ausreichend geklärt; nach MAURICE und HALE soll ein aktiver Transport über das Endothel ins Stroma stattfinden, wo die weitere Verteilung dann durch Diffusion erfolgt. Andere Versuchsergebnisse (REIM, TURSS) sprechen für eine einfache Diffusion der Glucose aus dem Kammerwasser entsprechend dem Konzentrationsgradienten, während Laktat und Pyruvat umgekehrt auf diesem Wege abtransportiert werden (REIM).

Der Abbau der Glucose erfolgt hauptsächlich über den Embden-Meyerhof-Weg, aber auch über den Citronensäurezyklus und den Pentosephosphat-Zyklus, wie Untersuchungen über Enzymaktivitäten erkennen ließen (MAURICE, RILEY, BAUM, REIM und SCHRAMM). Die größte Stoffwechselaktivität weist das Hornhautepithel auf, was LANGHAM durch in vitro Messungen der Glykolyse in Epithel und Stroma bewies; dasselbe wurde später von REIM und SCHMIDT durch ein entsprechendes Metabolitverteilungsmuster bestätigt.

Für die Transparenz der Hornhaut ist ihr Wassergehalt ein wichtiger Faktor. Experimentelle Ödeme der Cornea durch mechanische Schädigung von Epithel und Endothel (MAURICE und GIARDINE) sowie durch Abkühlung des Gewebes (HARRIS und DAVSON) zeigen die dominierende Rolle der beiden "Grenzmembranen" und die Bedeutung ihres intakten Stoffwechsels für den Dehydratationsmechanismus der Hornhaut. Epithel und Endothel halten einen gerichteten Stoffaustausch aus den beiden hypertonen Flüssigkeiten Kammerwasser und Tränenflüssigkeit, der die Hornhautquellung verhindert, aufrecht. Allerdings scheinen allein physikalische Kräfte, die für das Eindringen von Wasser in das Parenchym verantwortlich sein können, für die normale Entwässerung des Stromas nicht ausreichend. Vielmehr ist der Mechanismus der Dehydratation temperatur- und sauerstoffabhängig (SMELSER, DAVSON, HARRIS, LANGHAM), d. h. er hängt von der Stoffwechselleistung der bedeckenden Zellschicht ab. Durch sogenannte Exklusionsversuche (Abschaben des Epithels) haben MISHIMA und KUDO, DICKSTEIN und MAURICE festgestellt, daß das Endothel die stärkere "Pumpe" besitzt. Die Funktion der Hornhaut als transparenter optischer Apparat hängt somit eng mit einem intakten Energiestoffwechsel zusammen.

3. Das Kammerwasser

Neben der Funktion im optischen System des Auges und bei der Regulation des Augeninnendruckes ist die Versorgung der Cornea mit Metaboliten die Hauptaufgabe des Kammerwassers. Für den Metabolitgehalt des Kammerwassers ist die Blut-Kammerwasser-Schranke von Bedeutung; so durchdringt z. B. Glucose schnell die Barriere, je nach Anforderung der Stoffwechsellage im Auge; dasselbe gilt für Wasser (DAVSON). Bei Zusammenbruch der Blut-Kammerwasser-Barriere findet man Fibrinogen und erhöhte Proteinwerte im Kammerwasser, dies kann z. B. durch plötzliche intraokulare Druckschwankungen geschehen (DAVSON und WELD). Die sogenannte Halbwertszeit des Kammerwassers in der Vorderkammer beträgt etwa 45 Minuten (DAVSON). Das Kammerwasser unterliegt also während dieser Zeit in der Vorderkammer verschiedenen Einflüssen, so z. B. Diffusionsvorgängen mit der Linse und besonders mit der Cornea, deren Glucoseverbrauch, Lactatbildung etc., d. h. deren Stoffwechsellage, die Zusammensetzung des Kammerwassers beeinflußt. Die relativen Konzentrationen von Metaboliten in der Hornhaut und im Kammerwasser werden von der Permeabilität des Endothels kontrolliert, da die Descemetsche Membran in beiden Richtungen für kolloidale Teilchen durchlässig ist (KAYE).

Konzentrationen einiger Metabolite in Kammerwasser und Blutplasma vom Kaninchen (DAVSON).

	Plasma mMol/kg H_2O	Kammerwasser mMol/kg H_2O
Lactat	4,3	7,4
Pyruvat	0,22	0,66
Glucose	8,3	6,9

4. Kryotherapie und Frierеffekte an der Hornhaut

Die Kryobiologie, als relativ junge Wissenschaft, hat dennoch schon ihren Wert auf mehreren Gebieten der Naturwissenschaften bewiesen. So nimmt sie heute in der Physik, Chemie, Zoologie, Botanik und nicht zuletzt in der Medizin (z. B. bei Lagerung von Transplantaten, in der Neurochirurgie, in der Hämatologie etc.) ihren festen Platz ein. Erst seit kurzer Zeit jedoch scheint sich auch in der Ophthalmologie die Kryotherapie bei der Behandlung verschiedener Augenerkrankungen stärker durchzusetzen, nachdem BIETTI (1933) und DEUTSCHMANN (1935) die Pionierarbeit bei der Kältebehandlung von Netzhautrissen geleistet hatten. Die Anwendungsbereiche der Kryotherapie am Auge erfahren mehr und mehr Ausdehnung: z. B. Kryoextraktion der Linse (KRWAWICZ, COOPER und KELMAN, BELLOWS u.a.), Kryoretinopexie (BIETTI, LINCOFF und McLEAN, KELMAN u.a.), Zyklokryothermie (POLACK und DeROETTH, HAYE, McLEAN und LINCOFF, BIETTI) und nicht zuletzt die Kryobehandlung der Cornea. Die Kältetherapie der Keratitis dendritica wurde von mehreren Autoren durchgeführt, so von KRWAWICZ (1965), BELLOWS (1966, 1969) und PAUFIQUE (1968). Trotz einiger kritischer Stellungnahmen von CORVIN et al. 1967 und von KAUFMANN 1968 läßt sich ein gutes Behandlungsergebnis der Herpes-simplex-Keratitis mit der Kryomethode verzeichnen. Vielmehr konnten sogar über lange Zeit bestehende ulceröse Hornhautveränderungen erfolgreich durch mehrmalige Kälteapplikationen behandelt werden (STRAUB 1964, 1965). Ein wiederholtes Einfrieren der Cornea hat keine schädlichen Auswirkungen auf ihre Transparenz und läßt die Temperatur der vorderen Augenabschnitte nicht bemerkenswert abfallen. STRAUB stellte nach 5 Sekunden dauernder Vereisung des Hornhautzentrums einen durchschnittlichen Temperaturabfall von 1,5° C fest; vor der Vereisung wurde die Temperatur am vorderen Hornhautpol durchschnittlich mit 28° C gemessen. Nach bisher bekannten klinischen Beobachtungen sind Hornhauttrübungen

des menschlichen Auges, die ihre Ursache in einer Kälteeinwirkung haben, weitgehend reversibel. Erst nach längerer starker Kälteeinwirkung (15 Minuten und länger) kann es zu ausgesprochenen Kälteschäden am Auge, z. B. zur Vascularisation der Cornea, kommen (VELHAGEN, TOST und FUHRMEISTER). Mit Hilfe der Licht- und Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, daß nach Vereisung und Wiederauftauen eine vorübergehende Schädigung der Hornhautzellen eintrat (MAUMENEE und KORNBLUETH, CHI und KELMAN, SOMMERVILLE und SHEA, TANAKA u.a.). Das sich nach Vereisung einstellende Corneaödem ist wohl hauptsächlich auf die erhöhte Empfindlichkeit der Endothelzellen für niedrige Temperaturen zurückzuführen; es liegt also eine Störung ihrer aktiven Leistung bei der Entwässerung des Corneaparenchyms vor. Das Hornhautepithel zeigte nach starker Kälteapplikation vereinzelt vacuolige Auftreibungen und blasige Abhebung von Zellen (TOST und FUHRMEISTER), im Elektronenmikroskop ist eine Degeneration des Golgi-Apparates zu beobachten (AONO). Außerdem kommt es durch die Temperaturabnahme zu intraokularen Druckschwankungen, einem initialen Druckanstieg (5 - 15 mm Hg) mit nachfolgender Hypotonie (8 - 1o mm Hg) nach 3 - 1o Tagen (BIETTI). Die Kälteschädigung der Zellen ist hauptsächlich von zwei Faktoren abhängig, dem physiologisch-chemischen (durch die Bildung von Eiskristallen im extrazellulären Raum findet eine Dehydrierung statt, verbunden mit einer Erhöhung der elektrolytischen Konzentration bis zum Toxischen, was zur Schädigung der Lipoproteinverbindungen der Zellmembranen führt) und dem mechanischen (intrazelluläre Kristallbildung).
Eine Regeneration der Zellstrukturen in Epithel und Endothel wurde nach 24 - 96 Stunden beobachtet, abhängig von der bei der Vereisung angewandten Temperatur und der Dauer der Kälteapplikation; während die Regeneration der Stromazellen nach 1 - 2 Wochen abgeschlossen war.

Obwohl über die klinischen Auswirkungen und die histologischen Untersuchungen bei Vereisung zahlreiche Veröffentlichungen existieren, gibt es nur wenige Informationen über die biochemischen Veränderungen in der Hornhaut nach Kälteapplikation. In Versuchen am Kaninchen bestimmten wir die Konzentrationen einiger Metabolite des energieliefernden Stoffwechsels in der Cornea nach Vereisen und Wiederauftauen. Die Ergebnisse lassen vermuten, daß chemische Veränderungen nach Anwendung der Kryotherapie von gleicher Wichtigkeit sein dürften wie Strukturveränderungen.

II. FRAGESTELLUNG

Dem anatomischen und histologischen Aufbau der Cornea entsprechend kann man auch in den einzelnen Schichten eine Differenzierung ihrer biochemischen Leistungen erwarten, wie auch von mehreren Arbeitsgruppen bewiesen wurde (REIM und SCHMIDT, REIM et al., SÖLLNER, HOCKWIN, MAURICE und RILEY u.a.). Dazu kommt, daß die besonders im Elektronenmikroskop beobachteten Strukturveränderungen der Hornhautzellen nach Vereisung sich ebenfalls in ihrer Stoffwechselleistung manifestieren. Gehaltsbestimmungen einer Anzahl von Metabolite in verschiedenen Stadien der Gewebealteration nach Kälteapplikation können Einblicke in die dynamischen Veränderungen des Energiestoffwechsels geben. Die Analyse sollte Veränderungen der einzelnen Metabolite sowie ihrer Reaktion zueinander zeigen. Der Vergleich von Metabolitspiegeln in benachbarten Kompartimenten erlaubt es, unter bestimmten Bedingungen eine Aussage über Metabolitbewegungen zu treffen. Dabei können die Konzentrationsgradienten Rückschlüsse auf den Stofftransport in den gefäßfreien Teilen des Auges erlauben. Die Effekte der Kälteeinwirkung hängen natürlich vom Zell- bzw. Gewebetyp ab, wobei zu klären ist, inwieweit die abgrenzenden Zellschichten, besonders das Endothel als Permeabilitätsbarriere, die Metabolitkonzentrationen in der übrigen Hornhaut und auch im Kammerwasser kontrollieren.
Um bei der Lösung dieser Probleme den in vivo Verhältnissen der Hornhaut möglichst nahe zu kommen, ist eine geeignete Fixierung und ein schonendes Extraktionsverfahren anzuwenden.

Die hier ausgeführten Untersuchungen sollten daher ein Beitrag zur Beantwortung folgender Fragen sein:

a) Normalwerte ausgewählter Stoffwechselmetabolite in der Hornhaut und im Kammerwasser als Maßstab der Alteration nach Vereisung.

b) Vergleich der Änderung von Metabolitkonzentrationen nach kurzer lokaler Vereisung der Cornea und Wiederauftauen, wobei die Zeitspanne des Wiederauftauens variiert wurde.
c) Beeinflussung der Metabolitspiegel in der Hornhaut und im Kammerwasser durch Endothelschäden nach Vereisung und nach Endothelabrasio.
d) Versorgung der Cornea mit Nährstoffen in Abhängigkeit vom Augeninnendruck.

Bei der gesamten Problemstellung verdienen die Änderungen der Konzentrationsgradienten der Metabolite in den einzelnen Hornhautkompartimenten Epithel, Stroma und Kammerwasser, die alle demselben biologischen System zugehörig sind, besondere Beachtung betreffs der Ernährung und damit der Transparenz des Gewebes.

III. METHODIK

1. Narkose und Versuchsvorbereitung

Unsere Versuche führten wir an Kaninchen (Rasse: Deutscher Widder) aus, die als gesunde Tiere durchschittlich 3 - 4 kg wogen. Als Narkosemittel benutzten wir Nembutal (Pentobarbital-Natrium, Fa. ABBOT), das in die Ohrvene injiziert wurde. Die Dosierung wurde nach dem Körpergewicht des Kaninchens berechnet, indem pro kg KG 35 mg gegeben wurden. Bis zum Eintritt der Vollnarkose trat nur sehr selten ein leichtes Excitationsstadium auf. Zusätzlich tropften wir die Hornhaut bei jedem Auge mit dem Lokalanästheticum Novesine o,4 % (Fa. WANDER); Dosierung etwa 2 - 3 Tropfen pro Auge. Beide Augen des Versuchstieres wurden jeweils für die gleiche Versuchsreihe unter denselben experimentellen Bedingungen präpariert, und zwar jeweils das linke Auge vor dem rechten. Mit einem Lidsperrer weiteten wir die Augenspalte und faßten mit zwei Kocherklemmen die Musculi recti inferior und superior, so daß der Bulbus für die Operation leicht luxiert und fixiert war.

2. Operation zur Präparatgewinnung

Das Hornhautepithel wurde je nach Art des Versuches feucht mit einem Hockeymesser in situ abradiert oder mit dem gesamten Hornhautpräparat eingefroren und später abgekratzt, wie bei der Beschreibung der Einzelserien noch erwähnt wird. Zur Gewinnung des Kammerwassers stachen wir mit einer 20er Kanüle limbusnah schräg durch die Cornea und zogen das Kammerwasser (KW) mit einer 1 ccm Rekordspritze ab. Anschließend wurde es in o,5n eisgekühlte $HClO_4$ überführt, gewogen (METTLER Halbmikro-Waage H 16, Fa. SPOERHASE) und im Eisbad bis zur weiteren Aufbereitung gehalten. Die Punktionsstelle erweiterten wir mit einem sterilen Einmal-Skalpell der Fa. GILETTE (Shape D/15) und excidierten dann mit einer

gebogenen Hornhautschere in 1 mm Limbusabstand die Cornea. Die Rückfläche der Hornhaut säuberten wir falls notwendig von KWresten oder Blutspuren durch leichtes Abtupfen mit Kleenexpapier. Die so excidierte Cornea wurde anschließend durch das Frierstopverfahren (REIM, MEYER, CATTEPOEL) fixiert. Mit Hilfe der Spezial-Hornhautzange (REIM, BITTMANN, KILP), Einsatzteilgröße 11 mm, konnte eine Verformung und Faltenbildung des Corneapräparates verhindert werden. Nachdem die Hornhaut auf die in flüssigem Stickstoff vorgekühlte Zange aufgebracht und festgeklemmt wurde, lagerten wir sie bis zur weiteren Verarbeitung in flüssigem Stickstoff. Die Gewinnung des Corneapräparates - Excision, Säuberung, Frierstop - dauerte etwa 1 Minute.

3. Hornhautepithelgewinnung nach Frierstop

Da wir für die Metabolitanalyse im Epithel eine Zerstörung des Zellverbandes möglichst vermeiden wollten, froren wir die Epithelschicht in Zusammenhang mit dem Corneaparenchym ein. In der Hornhautzange fixiert, konnten wir es leicht unter flüssigem Stickstoff in einem Mörser abschaben. Für die Abrasion entwickelten wir einen speziellen Kratzer, dessen konkave Schneide der Konvexität der Hornhautzange (dem in vivo Krümmungsradius, 7,5 mm, nachgebildet) mit der aufliegenden Cornea entsprach. Die Epithelzellschicht ließ sich als feinkörniger Staub und in kleinen Schollen von der darunterliegenden Stromaschicht ablösen. Anschließend kratzten wir im Dewar-Gefäß mit einem scharfen Skalpell die Oberfläche des Parenchyms nach, um nicht durch eventuelle Epithelreste die Metabolitanalyse des Stromas zu verfälschen.

4. Lyophilisation

Mit einem Korkbohrer, der den gleichen Durchmesser (11 mm) hatte wie der bei der Hornhautzange benutzte Einsatzteil, lösten wir die Hornhaut, bestehend aus Stroma und Endothel unter flüssigem Stickstoff aus der Zange. In einem Kühlraum des Biochemischen Instituts wurde bei -4° C das Feuchtgewicht bestimmt. Wir gebrauchten dazu eine CAHN-Waage (CAHN GRAM ELECTROBALANCE Modell G) der Fa. CAHN INSTRUMENT COMPANY, Paramount. Während des kurzen Wägevorganges blieben die Präparate gefroren. Die gefrorenen Gewebsstücke brachten wir in kleinen Gläsern in die Lyophilisieranlage (Modell SCHNITTGER, Fa. KNIESE), wo sie für ca. 24 Stunden blieben. Die so gefriergetrockneten Hornhautpräparate wurden zur Bestimmung des Trockengewichtes, in einem verschlossenen Glas gegen Feuchtigkeitsadsorption geschützt, erneut in den Kühlraum gebracht. Nach 1o Minuten Wartezeit zur Temperaturadaptation stellten wir mit der CAHN-Waage das Trockengewicht fest. Aus dem Frischgewicht und dem Trockengewicht können Wassergehalt (Q) und Hydratation (Q-1) des Gewebes ermittelt werden.

$$Q = \frac{\text{Frischgewicht}}{\text{Trockengewicht}}$$

$$Q-1 = \frac{\text{Frischgewicht-Trockengewicht}}{\text{Trockengewicht}} = \frac{\text{Gewebswasser}}{\text{Trockengewicht}}$$

5. Extraktgewinnung

a) Epithel nach Frierstop:

Das von den beiden Hornhäuten desselben Versuchstieres abgekratzte Epithel wurde umgehend als Staub in einen Glas-in-Glas Homogenisator nach Potter-Elvejhem überführt, der nach Gewichtsbestimmung im Eisbad vorgekühlt und mit 1 ml kalter $HClO_4$ (o,5n) gefüllt wurde. In ca. 2 Minuten zerkleinerten wir das Gewebe mit einem Rührmotor im Eisbad und zentrifugierten es im selben Gefäß

für 1o Minuten bei 2ooo x g in einer Christ-Universal-Junior III Zentrifuge (Fa. CHRIST) mit vorgekühltem Halter. Die dekantierte Flüssigkeit neutralisierten wir mit 1On KOH nach der Tüpfelmethode (Spezialindikatorpapier MERCK) auf einen pH von 7,o; danach wurde der Extrakt erneut mit derselben Zentrifuge unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Den so erhaltenen klaren Überstand gossen wir in ein Präparateglas ab. Sofort anschließend an die Präparatgewinnung erfolgte die Bestimmung der Metabolitgehalte. Die Bereitung des Epithelextraktes dauerte etwa 25 - 3o Minuten.
Der Gewebsrückstand im Pottergefäß wurde bis zur Gewichtskonstanz im Trockenschrank (Fa. HERAEUS) bei 90° C aufbewahrt und dann gewogen. Das erhaltene Gewicht abzüglich des anfangs ermittelten Pottergewichtes gab das Trockengewicht unseres Epithelstaubes an. Durch Multiplikation dieses Gewichtes mit dem statistisch ermittelten Faktor 2,95 (REIM und SCHMIDT) konnte das Feuchtgewicht des Hornhautepithels jeweils berechnet werden.

b) Lyophilisiertes Stroma:

Das lyophilisierte Hornhautstroma (+ anhängendem Endothel) überführten wir in o,8 ml kalte $HClO_4$ (0,5n) im Glaspotter und homogenisierten das Gewebe im Eisbad mit dem Rührmotor für 3o - 6o Minuten, bis keine Gewebsstücke mehr zu sehen waren. Danach erfolgte das Zentrifugieren in der Christ-Junior III Zentrifuge mit vorgekühltem Einsatz bei 4ooo x g für 1o Minuten. Der Überstand wurde in ein Zentrifugenglas aus Polyäthylen dekantiert, während das Sediment zur Nachextraktion mit o,8 ml $HClO_4$ (o,125n) für 2 Minuten homogenisiert und nochmals bei 4ooo x g für 1o Minuten zentrifugiert wurde. Der Rückstand wurde verworfen; die vereinigten Überstände neutralisierten wir gekühlt im Eisbad wie in Kapitel 5a. Das ausfallende Perchlorat wurde durch erneutes Zentrifugieren für 1o Minuten bei 25ooo x g und ca. 0° C

abgetrennt (Kühlzentrifuge "Omikron", Fa. CHRIST). Der klare Überstand wurde im Präparateglas zur Metabolitanalyse im Eisbad aufbewahrt; die Testung erfolgte noch am selben Tag.

c) Kammerwasser:

Das Kammerwasser (KW) wurde aus der Spritze in die mit 1 ml $HClO_4$ (0,5n) gefüllten, vorgewogenen, eisgekühlten Gläser gebracht und nachgewogen. Dazu wurden Aqua bidest. gegeben, so daß das Verhältnis KW : Endvolumen ungefähr 1 : 1o war. Danach erfolgte die Neutralisation mit 1On KOH w.o. und Zentrifugieren 1o Minuten lang bei 25ooo x g. Am Überstand wurde die Metabolitanalyse ausgeführt.

6. Metabolitbestimmungen

a) Testmethode:

Die Analysen der Metabolite führten wir mit Hilfe des enzymatisch optischen Tests nach HOHORST, KREUTZ und BÜCHER aus. Dabei wurden die Extinktionsunterschiede durch das Photometer Eppendorf (λ = 334 nm) mit Philips-Registriereinrichtung und das Beckmann-Photometer DK 2A (λ = 34o nm) aufgezeichnet. Wir benutzten Kuvetten aus Normalglas; je nach Test Normalkuvetten der Schichtdicke d = 1 cm oder Halbmikrokuvetten mit d = 2 cm. Die Flüssigkeitsmengen der Testansätze wurden je nach Quantum mit den Mikropipetten "Marburg" (Fa. EPPENDORF) oder mit Stangenpipetten abgemessen. Die gekühlten Gewebsextrakte und Reagentien rührten wir nach Einbringen in die Kuvetten vorsichtig mit Kunststoffstäbchen durch und setzten sie in den Kuvettenhalter ein, der mit einem Thermostaten auf 27° C gehalten wurde. Nach Überprüfung des Rühreffektes und Verlaufskontrolle des Schreibers konnten die Testreaktionen durch das Einbringen der Startenzyme mittels Trovidurstäbchen begonnen werden. Als Kontrolle

für das Funktionieren des Tests sind Nachstart mit dem Substrat am Ende der Bestimmung, Proportionalitäts- und Reproduzierbarkeitsprüfungen ausgeführt worden. Die biochemischen Testreagentien wurden von den Firmen BOEHRINGER und MERCK geliefert.
Im Hornhautepithel und -stroma bestimmten wir je die Metabolite Glucose, Lactat, Pyruvat, ATP, ADP und AMP; im KW wurde Glucose, Lactat und Pyruvat ermittelt.

Berechnung der Metabolitkonzentrationen:

Die Berechnung erfolgte nach der Gleichung

$$\frac{E \times \text{Testvolumen} \times \text{Extraktvolumen}}{\varepsilon \times d \times \text{Einsatzvolumen} \times \text{Gewebsgewicht}} = \text{Metabolitgehalt in Mol/g frisch}$$

E = Extinktionsdifferenz
ε = Extinktionskoeffizient (bei 334 nm = $6{,}09 \times 10^6$)
(bei 340 nm = $6{,}28 \times 10^6$)
d = Schichtdicke der Kuvette

Der Quotient Extraktvolumen / Gewebsgewicht wird in den Versuchstabellen als F_{feucht} geführt.

Die Metabolitgehalte wurden in Epithel und KW in nMol/g frisch angegeben. Im Hornhautstroma wurden sie teilweise auf Trockengewicht oder auf den Wassergehalt umgerechnet.
Umrechnung von nMol/g Frischgewicht auf nMol/g Trockengewicht:

$$\text{nMol/g trocken} = \text{nMol/g frisch} \times Q$$

Umrechnung von nMol/g Frischgewicht auf nMol/g H_2O:

$$\text{nMol/g } H_2O = \text{nMol/g frisch} \times \frac{Q}{Q - 1}$$

nm = 10^{-9} m
nMol = 10^{-9} Mol

b) Testansätze:

Im Hornhaut-Epithel:

ATP-Bestimmung

Schreibskala 0 - 0,250; 334 nm; Halbmikrokuvette d = 2.
0,65 ml TRAP 100mM/EDTA 1mM pH 7,6
0,01 ml $MgCl_2$ 100mM
0,01 ml Glucose 25mM
0,01 ml NADP 25mM c = 20
0,01 ml G-6-PDH c = 5 1:20
0,30 ml Extrakt
Start mit 0,005 ml HK c = 10 1:10

BTS-, ADP-, AMP-Bestimmung

Schreibskala 0 - 0,250; 334 nm; Halbmikrokuvette d = 2.
0,50 ml TRAP 100mM/EDTA 1mM pH 7,6
0,01 ml $MgCl_2$ 100mM
0,01 ml NADH 11mM c = 2
0,5 ml Extrakt

BTS-Bestimmung: Start mit 0,005 ml LDH c = 5 1:10
ADP-Bestimmung: Nach Ablauf der 1. Reaktion Zugabe von 0,02 ml PEP-C 32mM c = 5; Start mit Spur von PK 1:1 c = 2.
AMP-Bestimmung: Nach Ablauf der 2. Reaktion Start mit Spur von MK c = 5 1:5.

D-Glucose-Bestimmung

Schreibskala 0 - 0,250 bei 334nm oder
Schreibskala 75 - 125 (Transmission) bei 340nm.
Halbmikrokuvette d = 2.
0,50 ml TRAP 100mM/EDTA 1mM pH 7,6
0,01 ml $MgCl_2$ 100mM
0,01 ml ATP 75mM c = 45,5
0,01 ml G-6-PDH c = 5 1:20
0,01 ml NADP 25mM c = 20
0,10 ml Extrakt
0,40 ml H_2O bidest.
Start mit 0,01 ml HK c = 10 1:10

L(+)-Lactat-Bestimmung

Schreibskala 0 - 0,500; 334nm oder 340nm.
Normalkuvette d = 1.
0,45 ml Hydrazinpuffer nach HOHORST (s.u.)
0,05 ml NAD 60mM c = 40
0,05 ml Extrakt
0,45 ml H_2O bidest.+)
Start mit 0,02 ml LDH c = 5 1:1

+) Das destillierte Wasser wurde regelmäßig auf eventuellen Lactat-Gehalt untersucht.

Hydrazinpuffer nach HOHORST:

0,4 m Hydrazinsulfat
1,0 m Glycokoll
0,005 m EDTA
mit 51 ml 2n NaOH auf pH 9,5 einstellen.

Der Puffer wurde nach der Bereitung in kleinen Portionsgläsern eingefroren und konnte dann jeweils für den täglichen Bedarf aufgetaut werden. Sämtliche L(+)-Lactat-Teste wurden im Doppeltest mit Prüfung der Proportionalität bestimmt.
Die LDH wurde für den Lactat-Test folgendermaßen aufbereitet: Zentrifugieren der LDH (BOEHRINGER) in der Kühlzentrifuge bei 25000 x g 10 Minuten lang; Verwerfung des Überstandes; Aufwirbeln des Rückstandes mit Aqua bidest. zum gleichen Volumen. Die Aufbereitung erfolgte in Tagesrationen.

Im Hornhaut-Stroma:

ATP-Bestimmung

Schreibskala 0 - 0,250 bei 334nm oder
Schreibskala 75 - 125 (Transmission) bei 340nm.
Halbmikrokuvette d = 2.

0,50 ml	TRAP 100mM/EDTA 1mM		pH 7,6
0,005 ml	$MgCl_2$ 100mM		
0,01 ml	Glucose 25mM		
0,01 ml	NADP 25mM	c = 20	
0,005 ml	G-6-PDH	c = 5	1:20
0,50 ml	Extrakt		
Start mit 0,005 ml	HK	c = 10	1:10

BTS-, ADP-, AMP-Bestimmung

Schreibskala 0 - 0,250 bei 334nm oder
Schreibskala 75 - 125 (Transmission) bei 340nm.
Halbmikrokuvette d = 2.

0,50 ml	TRAP 100mM/EDTA 1mM		pH 7,6
0,005 ml	$MgCl_2$ 100mM		
0,01 ml	NADH 11mM	c = 2	
0,50 ml	Extrakt		

BTS-Bestimmung: Start mit 0,005 ml LDH c = 5 1:10
ADP-Bestimmung: nach Ablauf der 1. Reaktion Zugabe von 0,02 ml PEP-C 32mM c = 15.
Start mit Spur von PK 1:1 c = 2.
AMP-Bestimmung: nach Ablauf der 2. Reaktion
Start mit 0,005 ml MK c = 5 1:5.

D-Glucose-Bestimmung

Schreibskala 0 - 0,250 bei 334nm oder
Schreibskala 75 - 125 (Transmission) bei 340nm.
Halbmikrokuvette d = 2.

0,50 ml TRAP	100mM/EDTA 1mM		pH 7,6
0,01 ml $MgCl_2$	100mM		
0,01 ml ATP	75mM	c = 45,5	
0,01 ml G-6-PDH		c = 5	1:20
0,01 ml NADP	25mM	c = 20	
0,10 ml Extrakt			
0,40 ml Aqua bidest.			
Start mit 0,01 ml HK		c = 10	1:10

L(+)-Lactat-Bestimmung

Schreibskala 0 - 1,0 bei 334nm oder 340nm;
Normalkuvette d = 1.

0,45 ml Hydrazinpuffer nach HOHORST			
0,05 ml NAD	60mM	c = 40	
0,10 ml Extrakt			
0,40 ml Aqua bidest.			
Start mit 0,02 LDH		c = 5	1:1

Nachtrag zu Adenosinphosphat-Bestimmung in Hornhaut-Epithel und -Stroma:
Die Enzyme LDH, G-6-PDH, HK und MK wurden für die Testansätze jeweils zentrifugiert (25000 x g für 10 Minuten $0^{\circ}C$), dekantiert und das Sediment mit dem gleichen Volumen Aqua bidest. gelöst.

Im Kammerwasser:

D-Glucose-Bestimmung

Schreibskala 0 - 1,000 bei 334nm oder 340nm;
Normalkuvette d = 1.

0,50 ml TRAP	100mM/EDTA	1mM	pH 7,6
0,01 ml $MgCl_2$	100mM		
0,01 ml ATP	75mM	c = 45,5	
0,01 ml G-6-PDH		c = 5	1:20
0,01 ml NADP	25mM	c =20	
0,10 ml Extrakt			
0,40 ml Aqua bidest.			
Start mit 0,01 ml HK		c = 10	1:10

BTS-Bestimmung

Schreibskala 0 - 1,000 bei 334nm oder 340nm;
Normalkuvette d = 1.

0,50 ml TRAP	100mM/EDTA	1mM	pH 7,6
0,01 ml NADH	11mM	c = 2	
0,50 ml Extrakt			
Start mit 0,005 ml LDH		c = 5	1:10

L(+)-Lactat-Bestimmung

Schreibskala 0 - 1,000 bei 334nm oder 340nm;
Normalkuvette d = 1.

0,45 ml Hydrazinpuffer nach HOHORST			
0,05 ml NAD	60mM	c = 40	
0,10 ml Extrakt			
0,40 ml Aqua bidest.			
Start mit 0,02 ml LDH		c = 5	1:1.

7. Versuchsreihen

a) Normale Augen:
Die Kaninchen wurden, wie oben beschrieben, vorbehandelt, operiert und die Präparate durch Frierstop und Lyophilisation nach der Excision fixiert. Bei allen Versuchen wurde Kammerwasser entnommen und getestet; das Hornhautepithel wurde nach Frierstop unter flüssigem Stickstoff abgekratzt und die Metabolitanalyse sofort durchgeführt; die Metabolitbestimmung im Hornhautstroma (+ Endothel) erfolgte direkt im Anschluß an die Extraktbereitung aus den gefriergetrockneten Präparaten.

b) in vivo Vereisung:
Die, wie in Kapitel III (1) narkotisierten und vorbereiteten Versuchstiere wurden jeweils am linken und dann am rechten Auge für 1 Minute vereist. Diese in vivo Vereisung erfolgte mit einem Aluminiumstempel, dessen Aufsatzfläche, mit einem Durchmesser von 11 mm, in ihrer Konkavität der konvexen Hornhautoberfläche entsprach. Nach vorsichtigen Aufsetzen des in flüssigem Stickstoff gekühlten Stempels für 5 sec, unter Vermeidung von Drehbewegungen und Seitwärtsverschiebungen, war die tiefgekühlte Hornhautoberfläche danach hart und weißgefroren. Diese Vereisung bildete sich beim Wiederauftauen schnell vom Rande her zurück, und die Hornhaut wurde wieder klar.
Die narkotisierten Tiere wurden nun in verschiedenen Zeitabschnitten nach der in vivo Vereisung : 30 Minuten, 60 Minuten gemäß der in Kapitel III (2,3) beschriebenen Methode präpariert. Wir konnten so das Verhalten einer einmal eingefrorenen Cornea mit dem ihr zugehörigen KW nach Vereisung und verschiedener Dauer des Wiederauftauens prüfen. Bei allen Versuchen bildete sich ein Hornhautödem aus; das Epithel war z.T. in grauen Schuppen auf der Oberfläche sichtbar; bei der 60 Minuten-Serie war das abgezogene KW stets proteinhaltig.

Einige Versuchstiere operierten wir erst 22 Stunden nach Vereisung. Die Cornea fiel hier durch ein starkes Ödem auf. Bei diesen Versuchen wurde das Hornhautepithel vor dem Frierstop feucht mit einem Hockeymesser vollständig abradiert und verworfen; das KW war trüb.
Die Aufbereitung sämtlicher Präparate der verschiedenen Versuchsserien (30 Minuten, 60 Minuten, 22 Stunden) erfolgte wie in Teil III (5) beschrieben.

c) Endothelabrasio in vivo:
Unter Vollnarkose (s.o.) eröffneten wir durch einen Schnitt mit einer spitzen doppelschneidigen Lanze limbusnah die Vorderkammer, wobei wir einen 3 mm breiten Spalt in der Cornea setzten. Mit einem Messer nach PAUFIQUE wurde danach das Hornhautendothel zentral und peripher abgekratzt und zerstört; die Hornhautwunde wurde mit Kleber (Histoacryl-blau, Fa. B. BRAUN, Melsungen) verschlossen und beide Augen mit Atropin (1%ig) getropft. Wir ließen die Tiere nach dem Eingriff für 60 Minuten ruhig liegen; während dieser Zeit stellte sich jeweils die Vorderkammer und die Hornhaut entwickelte ein gut sichtbares Ödem. Nach 60 Minuten erfolgte die Hornhautexcision wie unter III (1 und 2) angegeben, dabei war das abgezogene KW in allen Fällen leicht fibrinhaltig. Das Hornhautepithel wurde nach Frierstop abgekratzt und analysiert; KW und Hornhautstroma wurden zur Extraktgewinnung wie schon beschrieben behandelt und danach der enzymatisch-optischen Messung unterworfen.

d) Druckversuche in vivo:
Da es bei der in vivo Vereisung der Cornea zu intraokularen Druckschwankungen kommt (BIETTI), schien es uns interessant, diesen initialen Druckanstieg im Experiment nachzuahmen. Nach Behandlung der Versuchstiere wie in Kapitel III (1) beschrieben, durchstachen wir mit einer Flügelkanüle Kaliber 1,5 die Sklera und gingen in den Glaskörper ein. Aus einer mit gasförmigem Stickstoff gefüllten Stahlflasche setzten wir über

einen Gummischlauch, der mit der Kanüle verbunden war, einen Druck von ca. 1/2 kp/cm^2 im Glaskörper. Die Dauer der Druckerhöhung betrug pro Auge jeweils 10 Minuten. Der Druck konnte an einem zwischen Schlauch und Flasche geschalteten Manometer geregelt werden. Während des Versuchs bildete sich zusehends ein Ödem des Hornhautepithels aus, der Bulbus wurde steinhart. Sofort nach der 10-minütigen Drucksteigerung punktierten wir die Vorderkammer, zogen das KW ab und excidierten die Cornea wie oben in III (2) beschrieben. Das KW war in allen Fällen nicht eingetrübt; das Hornhautepithel wurde nach Frierstop abgekratzt und verworfen; das Stroma (+ Endothel) nach Frierstop lyophilisiert und weiter aufbereitet nach dem in Kapitel III (5b) angegebenen Verfahren. Die Messung der Metabolitkonzentrationen an KW und Hornhautstroma schloß die Versuchsreihe ab.

8. Statistische Auswertung

Für die Auswertung der einzelnen Ergebnisse ($x_1, x_2 \ldots x_n$) und ihrer Beziehung zueinander stand uns die Zentrale Rechenanlage der Universität Marburg zur Verfügung+). Mit Hilfe eines Computers wurden folgende Werte ermittelt:

Mittelwert $M = \frac{\Sigma x}{n}$

Streuung $s^2 = \frac{\Sigma x^2 - (M \times \Sigma x)}{n-1}$

Standardabweichung $s = \sqrt{\frac{\Sigma x^2 - (M \times \Sigma x)}{n-1}}$

Standardabweichung des Mittelwertes $s_M = \frac{s}{\sqrt{n}}$

+) Herrn Dipl.-Math. ZÖFEL danken wir für seine freundliche Hilfe.

Die Angabe der Ergebnisse erfolgt in der Zusammensetzung

$$M \pm s_M ,$$

wobei die Anzahl der Versuche n wichtig ist.
Das Programm unserer Auswertung setzte sich zusammen aus dem Vergleich der Mittelwerte (T-Test) für abhängige und unabhängige Stichproben und dem Vergleich der Streuungen (F-Test) für abhängige und unabhängige Stichproben.
Der Vergleich der abhängigen Stichproben stellt eine Beziehung zwischen den verschiedenen Kompartimenten des gleichen Auges bezüglich der Metabolitkonzentration fest. Der Vergleich der unabhängigen Stichproben setzt die Metabolitwerte aus gleichen Kompartimenten bei Anwendung unterschiedlicher Versuchsmethoden einander gegenüber. Die Berechnung der Konzentrationsgradienten läßt auf die Art von Zusammenhängen zwischen den Kompartimenten (Epithel, Stroma, KW) schließen.

9. Präparategewichte

Die abgezogene KW-Menge betrug im Durchschnitt pro Auge 0,25 - 0,30 ml. Für das Gewicht des trockenen Epithelrückstandes von jeweils beiden Augen eines Versuchstieres, nach Abkratzen der Gewebsschicht unter flüssigem Stickstoff nach Frierstop, erhielten wir einen Mittelwert von 3,9 mg. Dieser Wert liegt sicherlich zu hoch, was zur Folge hat, daß der Faktor Extraktvolumen/Gewebsgewicht aus der in Kapitel III (6) angegebenen Formel zu niedrig ausfällt. Die Metabolitkonzentrationen sind demnach im Epithel höher zu veranschlagen als in unseren Versuchsergebnissen. Der getrocknete Epithelstaub enthielt wahrscheinlich Metall- und Stromaspuren.

Wir berechneten den Faktor beim Frierstop-Epithel zwischen 70 und 130, REIM und SCHMIDT dagegen erhielten Werte zwischen 200 und 300.
Die lyophilisierten Hornhautpräparate hatten ein Mittelgewicht von 9,9 mg.

Trockengewichte von Hornhautepithel und Hornhautstroma beim Kaninchen in mg, $m \pm s_M$, n = Anzahl der Präparate.

	$M \pm s_M$	
Hornhautepithel (von beiden Augen)	3,9 ± 0,3 n = 18	REIM, SCHMIDT: 1,73 ± 0,09 n = 36
Hornhautstroma (von einem Auge)	9,9 ± 0,5 n = 38	

IV. ERGEBNISSE

Nach Vereisung und Wiederauftauen bildete sich am Kaninchenauge ein Hornhautödem aus, genauso wie man es am Menschenauge nach Kryotherapie beobachtet hatte. Der Hydratationswert (Q-1) des Corneaparenchyms läßt auf die Stärke des Ödems schließen.

	normal	vereist 30 Min.	vereist 60 Min.	vereist 22 Std.	Endothel abrasio	Druck-versuch
Q-1	3,27 ±0,10	3,80 ±0,14	4,87 ±0,20	9,85 ±0,50	5,14 ±0,22	3,37 ±0,23
n	19	6	12	4	12	9

Tab. 1: Hydratationswerte (Q-1) des Hornhautstromas bei den verschiedenen Versuchsreihen. Mittelwert M und Standardabweichung des Mittelwertes s_M . n = Anzahl der Versuche.

Das Corneaödem erreichte sein Maximum 3 oder 4 Tage nach Vereisung und verschwand dann allmählich, wie Versuche von LIPP zeigen. Der hohe Hydratationswert nach Endothelabrasio weist auf die wichtige Funktion dieser Grenzschicht für den Wasserhaushalt der Cornea hin.

1. Metabolitspiegel im Hornhautepithel

a) normal:

Tabelle 2, Spalte 1, zeigt die Metabolitgehalte des Hornhautepithels am normalen Auge nach Frierstop, in Spalte 2 sind die Metabolitkonzentrationen bei Versuchen von REIM und SCHMIDT (1967) aufgeführt. Unter Berücksichtigung der unter Kapitel III (9) erwähnten Tatsache, daß der Faktor F_{feucht} bei REIM und SCHMIDT durchschnittlich 2,5 bis 3 mal höher liegt als bei unseren Versuchen, fallen die Ergebnisse ähnlich aus.

Besonders der ATP/ADP-Quotient, der die Lage des Energiepotentials der Zelle anzeigt, liegt auch bei unseren Versuchen hoch.

Metabolit	n	M ± s_M	Vergleichswerte[+)]
Glucose	8	1307 ± 314	4400 n = 3
Lactat	8	14945 ± 3509	49600 n = 13
Pyruvat	10	314 ± 64	1160 n = 14
L/P	8	50 ± 6	42 n = 13
ATP	10	948 ± 302	2860 n = 14
ADP	9	161 ± 35	248 n = 14
ATP/ADP	9	7 ± 0,9	12 n = 14
AMP	8	144 ± 60	875 n = 14
AP	8	1354 ± 451	3983 n = 14

+) REIM und SCHMIDT 1967

Tab. 2: Metabolitgehalte des Hornhautepithels am Kaninchenauge nach Frierstop-Abrasio. Mittelwert M und Standardabweichung des Mittelwertes s_M in nMol/g Frischgewicht. n = Anzahl der Versuche.

b) vereist:

In Tabelle 3 sind die von uns im Epithel gemessenen Metabolitspiegel nach kurzer Vereisung und Wiederauftauen angeführt. Spalte 1 enthält die Werte für 30 Min. und Spalte 2 die für 60 Min. Dauer zwischen Vereisung und Frierstop. Der ATP-Gehalt nimmt im Vergleich zum Normalen wie bei früheren Experimentatoren beträchtlich ab, so daß der Quotient ATP/ADP von 7 auf 1 absinkt. Die Adenosinphosphate zeigen im Epithel sta-

tistisch signifikante Unterschiede ihrer Werte nach 30 und 60 Min., was auf verschiedene Grade der Gewebsalteration hinweist. Die Lactat- und Pyruvatgehalte sind nur geringfügig verändert, der Lactat/Pyruvat-Quotient bei 60 Min. allerdings steht in auffälligem Unterschied zu dem bei 30 Min. und ist statistisch signifikant unterschiedlich zum Normalwert, was auf eine Änderung der Stoffwechselaktivitäten hindeutet. Auffällig ist die Zunahme der Glucose im Hornhautepithel nach Vereisung. Nach 60 Min. steigt der Glucosegehalt auf das Vierfache an, d. h. der Glucoseverbrauch ist vermindert. In dieses Bild fügt sich bezüglich der Stoffwechsellage der Zelle auch der relativ niedrige Lactatwert im Epithel 60 Min. nach Vereisung ein.

Metabolit	M ± s_M 30 Min.	M ± s_M 60 Min.	Vergleichswerte +)
Glucose	2650 ± 2 n=2	5863 ± 1650 n=4	
Lactat	19883 ± 2643 n=3	13228 ± 1646 n=4	50200 ± 8100 n=6
Pyruvat	529 ± 121 n=3	503 ± 40 n=5	1490 ± 150 n=7
L/P	40 ± 5 n=3	25 ± 3 n=4	33 ± 6 n=6
ATP	287 ± 37 n=3	137 ± 18 n=5	672 ± 67 n=7
ADP	258 ± 45 n=3	74 ± 9 n=5	702 ± 66 n=7
ATP/ADP	1,2 ± 0,2 n=3	1,8 ± 0,2 n=5	0,9 ± 0,06 n=7
AMP	82 ± 19 n=3	137 ± 61 n=4	1660 ± 158 n=7
ΣAP	627 ± 85 n=3	326 ± 61 n=4	3034 ± 250 n=7

+) REIM und SCHMIDT 1967

Tab. 3: Metabolitgehalte des Hornhautepithels am Kaninchenauge nach kurzem Vereisen und Wiederauftauen in vivo. Frierstopabrasio. Mittelwert M und Standardabweichung des Mittelwertes s_M in nMol/g Frischgewicht. n = Anzahl der Versuche.

c) Endothelabrasio:

Wie aus der Tabelle 4 ersichtlich, liegt im Epithel 60 Min. nach Abkratzen des Endothels in vivo der Lactatwert auffällig niedrig. Er sinkt auf weniger als die Hälfte der Norm ab bei hohem ATP/ADP-Quotienten. Dazu paßt die gleichzeitig erhöhte Glucosekonzentration.

Metabolit	n	M	s_M	Unterschied zum normalen Auge
Glucose	5	2714	400	statistisch signifikant
Lactat	5	6472	739	auffällig
Pyruvat	5	284	29	
L/P	5	23	2	statistisch signifikant
ATP	4	862	101	
ADP	4	159	14	
ATP/ADP	4	6,1	0,7	
AMP	4	34	7	
AP	3	1055	223	

Tab. 4: Metabolitgehalte des Hornhautepithels am Kaninchenauge nach Endothelabrasio in vivo; Frierstop nach 60 Min.
Mittelwert M und Standardabweichung des Mittelwertes s_M in nMol/g Frischgewicht.
n = Anzahl der Versuche.

2. Metabolitspiegel im Hornhautstroma

a) normal:

Die Ergebnisse liegen im selben Größenbereich wie die der Voruntersucher. Im Stroma mit seinem vorwiegend extrazellulären Raum zeigen natürlich die extra- und intrazellulär auftretenden Metabolite Lactat, Pyruvat und Glucose eine verhältnismäßig hohe Konzentration, während die nur intrazellulären Adenosinphosphate wesentlich niedrigere Werte aufweisen als im Epithel. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen sind in Tabelle 5 zusammengefaßt und verglichen.

Metabolit	n	M ± s_M	Vergleichswerte $M^{+)}$		$M^{++)}$	
Glucose	16	3647 ± 371	3061	n=14	3630	n=15
Lactat	17	9240 ± 694	7058	n=15	9660	n= 5
Pyruvat	18	277 ± 31	244	n=15	360	n=15
L/P	17	35 ± 2	29	n=15	27	n=12
ATP	16	143 ± 18	103	n=15	198	n=22
ADP	12	59 ± 10	57	n=15	71	n=22
ATP/ADP	12	3,0 ± 0,4	2,1	n=15	3,0	n=22
AMP	8	37 ± 8	183	n=15	74	n=14
AP	8	235 ± 35	341	n=15		
Hydratation	19	3,27 ± 0,1				

+) SCHMIDT 1967

++) REIM, BITTMANN, KILP 1969

Tab. 5: Metabolitgehalte des Hornhautstromas am Kaninchenauge nach Frierstop. Mittelwert M und Standardabweichung des Mittelwertes s_M in nMol/g Frischgewicht. n = Anzahl der Versuche.

b) vereist:

Tabelle 6 zeigt die Ergebnisse nach Vereisung und verschieden langer Dauer des Wiederauftauens und stellt sie nebeneinander. 30 Min. nach Vereisung bei einem mittleren Hydratationswert der Cornea von 3,8 fällt auf, daß die Glucose- und Pyruvatwerte der Norm annähernd entsprechen. Die Lactatkonzentration und der L/P-Quotient dagegen zeigen statistisch signifikante Unterschiede zum Normalwert, was auch hier wie schon im Epithel auf eine mögliche Reduktion der Stoffwechselaktivität hinweist. Alle Adenosinphosphate fallen nach der Vereisung stark ab; ein besonders hoher signifikanter Unterschied besteht für ATP, das energiereichste von ihnen. Die Energieproduktion der Zelle scheint demnach durch die Vereisung herabgesetzt.
60 Min. nach Vereisung erreicht die Hydratation einen Mittelwert von 4,9. Mit diesem Anstieg der Hydratation geht eine deutliche Vermehrung der Stromaglucose parallel; die Differenz vom Normalwert sowie vom 30-Min.-Wert ist hochgradig statistisch signifikant. Die Lactatmenge nach der Vereisung ist auch nach 60 Min. noch eindeutig herabgesetzt. Der Konzentrationsabfall der Adenosinphosphate entspricht ungefähr dem 30-Min.-Wert.
22 Stunden nach Vereisung nimmt das Corneaödem weiter zu (mittlerer Hydratationswert von 9,9). Die Stromaglucose erreicht fast wieder Normalwerte, woraus man schließen kann, daß sich ein stetiger Abfall ihrer Konzentration seit dem Maximalwert bei 60 Min. entwikkelt hat. Der Lactatspiegel liegt auch jetzt noch sehr niedrig, was offensichtlich mit der weiteren Zunahme der Hydratation im Stroma eng zusammenhängt, während die ATP-Menge Minimalwerte erreicht.
Der Lactat-Pyruvat-Quotient zeigt einen auffälligen Unterschied zwischen den Werten der 30- und 60-Min.-Versuche sowie zwischen denen der 60-Min. und der 22-Stunden-Serie.

Metabolit	M ± s_M 30 Min.	M ± s_M 60 Min.	M ± s_M 22 Std.	eigene Normalwerte M ± s_M
Glucose	3299 ± 385 n=6	6262 ± 466 n=11	4835 ± 559 n=4	3647 ± 671 n=16
Lactat	5504 ± 756 n=6	8659 ± 628 n=11	5975 ± 545 n=4	9240 ± 694 n=17
Pyruvat	259 ± 23 n=6	282 ± 15 n=11	307 ± 39 n=4	277 ± 31 n=18
L/P	22 ± 2 n=6	31 ± 3 n=10	19 ± 2 n=4	35 ± 2 n=17
ATP	31 ± 3 n=6	31,4 ± 10 n=12	29 ± 10 n=2	143 ± 18 n=16
ADP	27 ± 4 n=6	26 ± 6 n=9		59 ± 10 n=12
ATP/ADP	1,4 ± 0,3 n=6	1,2 ± 0,2 n=9		3,0 ± 0,4 n=12
AMP	19 ± 4 n=3	29 ± 6 n=6		37 ± 8 n=8
AP	75 ± 4 n=4	113 ± 35 n=6		235 ± 35 n=8
Hydratation	3,8 ± 0,14 n=6	4,87 ± 0,20 n=12	9,85 ± 0,50 n=4	3,27 ± 0,10 n=19

Tab. 6: Metabolitgehalte des Hornhautstromas am Kaninchenauge nach kurzem Vereisen und Wiederauftauen in vivo.
Hornhaut nach Frierstop.
Mittelwert M und Standardabweichung des Mittelwertes s_M in nMol/g Frischgewicht.
n = Anzahl der Versuche.

c) Endothelabrasio:

Eine Stunde nach Endothelabrasio in vivo zeigen sich deutlich erhöhte Glucosewerte im Stroma, die fast die der 60-Min.-Werte nach Vereisung erreichen. Diese Beobachtung weist auf die verwandten Vorgänge im Corneagewebe bei Endothelabrasio und beim Vereisungsvorgang hin. Die Lactatwerte liegen im Bereich des Normalen; ebenso die ATP-Werte, so daß eine stärkere Schädigung der Zellen nicht anzunehmen ist. Die Hydratation beträgt im Durchschnitt 5,1.

Metabolit	n	M	s_M	Unterschied zum normalen Auge
Glucose	11	5417	420	auffälliger Unterschied
Lactat	12	9113	593	
Pyruvat	12	365	26	auffälliger Unterschied
L/P	12	25	2	auffälliger Unterschied
ATP	9	100	18	
ADP	9	33	3	
ATP/ADP	9	3,0	0,3	
AMP	7	34	3	
AP	7	179	22	
Hydratation	12	5,14	0,22	

Tab. 7: Metabolitgehalte des Hornhautstromas am Kaninchenauge nach Endothelabrasio in vivo. Frierstop nach 60 Minuten. Mittelwert M und Standardabweichung des Mittelwertes s_M in nMol/g Frischgewicht. n = Anzahl der Versuche.

d) Druckerhöhung:

10 Minuten nach extrem hohen Augeninnendruck sind die Werte für Glucose, Lactat und Pyruvat im Stroma stark erhöht. Die Adenosinphosphate liegen innerhalb der Norm. Der Hydratationswert wurde im Durchschnitt mit 3,4 gemessen, obwohl während der Zeit der Druckerhöhung ein ausgeprägtes Ödem sichtbar war, was zu diesem Zeitpunkt auf einen höheren Hydratationswert schließen läßt.

Metabolit	n	M	s_M	Unterschied zum normalen Auge
Glucose	9	4658	605	auffälliger Unterschied
Lactat	9	13100	962	statistisch signifikant
Pyruvat	9	419	57	statistisch signifikant
L/P	9	34	3	
Hydratation	9	3,37	±0,23	

Tab. 8: Metabolitgehalte des Hornhautstromas am Kaninchenauge nach Augeninnendruckerhöhung in vivo. Frierstop nach 10 Minuten. Mittelwert M und Standardabweichung des Mittelwertes s_M in nMol/g Frischgewicht. n = Anzahl der Versuche.

3. Metabolitspiegel im Kammerwasser

a) normal:

In Tabelle 9, Spalte 1, sind die Metabolitgehalte des Kammerwassers bei unseren Normalversuchen angegeben. Zum Vergleich dazu sind die Werte von Voruntersuchern und die Konzentrationen der gleichen Metabolite im Blutplasma in Spalte 2 und 3 aufgeführt.

Metabolit	M ± s_M n=17	Vergleichswerte M+) n=21	Blutplasma++) n=3
Glucose	6038 ± 418	6580	7220
Lactat	8148 ± 899	7450	2090
Pyruvat	320 ± 24	364	86
L/P	27 ± 2	21	24

+) REIM, BITTMANN, KILP 1969

++) REIM 1966

Tab. 9: Metabolitgehalte des Kammerwassers am Kaninchenauge in vivo, Normalversuch. Mittelwert M und Standardabweichung des Mittelwertes s_M in nMol/g H_2O. n = Anzahl der Versuche.

b) <u>vereist:</u>

Auffallend ist der erheblich erhöhte Glucosespiegel im KW nach Vereisung für die 30-Min.- sowie für die 60-Min.-Werte. In diesem Zusammenhang muß daran gedacht werden, daß das KW eine deutliche Trübung zeigte.
Die Lactat- und Pyruvatkonzentrationen weisen keine Veränderungen auf.
22 Stunden nach Vereisung erreicht die KW-Glucose wieder Normalwerte; der Lactatspiegel liegt auffallend niedrig und ist statistisch hochgradig signifikant unterschiedlich zum Normalen und zu den Ergebnissen aller anderen Versuchsreihen.

Metabolit	30 Min. $M \pm s_M$ n=6	60 Min. $M \pm s_M$ n=12	22 Std. $M \pm s_M$ n=4	signifkante Unterschiede zum Normalen
Glucose	8386 ± 525	7813 ± 443	6755 ± 722	30 Min,60 Min.
Lactat	7742 ± 332	7560 ± 743	3270 ± 115	22 Std.
Pyruvat	346 ± 16	318 ± 17	236 ± 22	
L/P	23 ± 1	23 ± 1	14 ± 1	22 Std.

Tab. 10: Metabolitgehalte des KW am Kaninchenauge in vivo nach kurzer Vereisung und Wiederauftauen.
Mittelwert M und Standardabweichung des Mittelwertes s_M in nMol/g H_2O.
n = Anzahl der Versuche.

c) Endothelabrasio:

Auch bei dieser Versuchsreihe ist die Glucose im KW stark vermehrt, während die Konzentrationen der anderen Metabolite innerhalb der Norm liegen.

d) Druckerhöhung:

Neben einer erheblich erhöhten KW-Glucose findet sich ein deutlich heraufgesetzter Lactatwert im KW.
Die Glucosewerte zeigen für beide Serien, Endothelabrasio und Druckerhöhung, statistisch signifikante Unterschiede zu den Normalergebnissen (α-Wert in %: $< 0{,}02$).

Metabolit	Endothelabrasio $M \pm s_M$ n=10	Druckerhöhung $M \pm s_M$ n=6	Normal $M \pm s_M$ n=17
Glucose	7836 ± 571	8672 ± 1300	6038 ± 418
Lactat	7902 ± 615	9737 ± 254	8148 ± 899

Tab. 11: Veränderte Metabolitgehalte des KW am Kaninchenauge nach Endothelabrasio und nach Druckerhöhung in vivo.
Mittelwert M und Standardabweichung des Mittelwertes s_M in nMol/g H_2O.
n = Anzahl der Versuche.

4. Vergleich der Metabolitspiegel in den Kompartimenten

Die Konzentrationsgradienten für die von uns getesteten Metabolite zwischen den Hornhautschichten Epithel und Stroma sowie dem KW verdienen besondere Beachtung, weil sie etwas über den Stofftransport in den vorderen Augenabschnitten aussagen. Diese Gradienten können als abhängige Stichproben behandelt werden, da sie am gleichen Auge gewonnen wurden.

a) normal:

Bei den Normalversuchen fällt auf, daß die Glucose im Epithel verglichen mit der Stromaglucose sehr niedrig liegt; der Gradient beträgt 0,36. Der entsprechende KW/Stroma-Gradient von 1,25 zeigt dazu, daß ein allmählicher Konzentrationsabfall für Glucose vom KW zum Hornhautstroma und von dort zum Epithel besteht. Lactat liegt im Epithel am höchsten. Der Gradient für Lactat Epithel/Stroma beträgt 1,62 und der Gradient KW/Stroma 0,67. Es besteht demnach eine gegenläufige Diffusion von Glucose und Lactat und eine Abnahme des Lactat-Gradienten vom Epithel zum KW hin. Für Pyruvat kann man

eine stetige Konzentrationsminderung zwischen Hornhautepithel und KW beobachten.

b) vereist:
30 Minuten nach Vereisung liegt der KW/Stroma-Gradient für Glucose sehr hoch: 2,02. Der Lactatwert ist im Stroma bereits auffällig niedrig, Gradient KW/Stroma 1,12 und auch das Pyruvat ist vermindert.
60 Minuten nach Vereisung finden wir immer noch eine hohe KW-Glucose, aber auch die Stromaglucose ist angestiegen, sie liegt jetzt fast genauso hoch. Der Gradient KW/Stroma für Glucose ist demzufolge auf 1,03 abgesunken. Im Epithel ist die Glucose ebenfalls stark vermehrt; der Gradient zum Stroma beträgt nur noch 0,93; während Lactat bei hohem Pyruvatspiegel auch im Epithel relativ niedrig liegt. Allerdings besteht jetzt kein deutlicher Ausgleich zwischen KW und Stroma für Lactat, der bei 30 Minuten sichtbar war.
22 Stunden nach Vereisung finden wir wieder eine normale Glucosemenge im KW; auch die Stromaglucose fällt auf Normalwerte hin ab, so daß der KW/Stroma-Gradient für Glucose den Normalwert 1,27 erreicht. Der Lactatspiegel im Hornhautstroma ist bemerkenswert herabgesetzt, aber auch im KW erscheint ein auffallend verminderter Lactatgehalt.

c) Endothelabrasio:
60 Minuten nach der in-vivo-Abrasio des Endothels sind die Glucosewerte im Hornhautepithel und -stroma erhöht, aber auch die Werte im KW sind gestiegen. Der Gradient vom KW zum Stroma für Glucose beträgt 1,21, ist also nicht überzeugend verschieden vom Normalen. Der Lactatgradient zwischen KW und Stroma entspricht der Norm.

d) Druckerhöhung:
Der Gradient für Glucose vom KW zum Stroma hat sich auf 1,43 erhöht, bei gleichzeitigem Abfall des Gradienten KW/Stroma für Lactat auf 0,57.

5. Konzentrationsgradienten bei den einzelnen Versuchsreihen

Um eine Änderung der Stoffwechsellage in den vorderen Augenabschnitten festzustellen, ist nicht nur die Untersuchung der einzelnen Metabolitgehalte unter den verschiedenen Versuchsbedingungen aufschlußreich, sondern die Änderung der Konzentrationsgradienten zwischen den Kompartimenten erscheint uns besonders interessant. An Tabelle 12 und Tabelle 13 können für die beiden wichtigen extracellulären Metabolite Glucose und Lactat das Verhalten der Konzentrationsgradienten zueinander und damit die Wege der Stoffwechseldiffusion unter den jeweiligen Bedingungen verfolgt werden. Für Glucose ist bei allen Versuchsreihen der Abfall vom KW über das Stroma zum Epithel zu erkennen; während beim Lactat die einzelnen Werte stärker variieren. So kommt es zu einer deutlichen Diffusionsstörung für Lactat 30 Min. nach Vereisung zwischen KW und Hornhautstroma und nach Endothelabrasio zwischen Epithel und Stroma.

Kompartimente	normal	vereist 30 Min.	vereist 60 Min.	vereist 22 Std.	Endothel abrasio	Druckerhg.
Epithel/ Stroma	0,36	0,81	0,93		0,50	
KW/ Stroma	1,25	2,02	1,03	1,27	1,21	1,43

Tab. 12: Konzentrationsgradienten für Glucose zwischen Kompartimenten am Kaninchenauge unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Die Berechnung erfolgte an abhängigen Stichproben.

Kompartimente	normal	vereist 30 Min.	vereist 60 Min.	vereist 22 Std.	Endothel abrasio	Druck-erhg.
Epithel/ Stroma	1,62	3,61	1,53		0,71	
KW/ Stroma	0,67	1,12	0,72	0,50	0,72	0,57

Tab. 13: Konzentrationsgradienten für Lactat zwischen Kompartimenten am Kaninchenauge unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Die Berechnung erfolgte an abhängigen Stichproben.

6. Adenosinphosphatverbindungen bei den einzelnen Versuchen

Das Verhalten der Adenosinphosphatverbindungen charakterisiert eine Veränderung im Energiestatus der Zellen und macht auf eventuelle Gewebsschädigungen aufmerksam.

Anhand der Tabelle 14 fällt im Hornhautepithel besonders der statistisch signifikante Unterschied für die ATP-Konzentration auf, der zwischen den Werten 30 und 60 Minuten nach Vereisung festzustellen ist. Auch die statistisch gesicherten Unterschiede im ATP/ADP-Quotienten nach Vereisung sind evident.

Im Hornhautstroma (Tabelle 15) sinken die Werte für ATP, ADP und den Quotienten ATP/ADP nach Vereisung so stark ab, daß die Unterschiede zur Norm statistisch signifikant oder zumindest auffällig sind. Keine bemerkenswerten Unterschiede finden sich nach Abrasio des Endothels und nach Erhöhung des Augeninnendruckes.

Metabolit	normal	normal	normal	vereist 30'	vereist 30'	vereist 60'
	ver-eist 30'	ver-eist 60'	Endoth. abr.	vereist 60'	Endoth. abr.	Endoth. abr.
ATP	0,05	0,03	0,86	$<$0,01	$<$ 0,01	$<$0,01
ADP	0,18	0,05	0,71	$<$0,01	0,02	0,20
ATP/ADP	$<$0,01	$<$0,01	0,92	0,05	$<$ 0,01	$<$0,01
AMP	0,56	0,94	0,13	0,50	0,05	0,19

Tab. 14: Auffällige und signifikante Unterschiede für die Adenosinphosphatverbindungen im Hornhautepithel unter den verschiedenen Versuchsbedingungen, bezogen auf Trockengewicht. Die Berechnung erfolgte an unabhängigen Stichproben (α-Werte in %).

Metabolit	normal	normal	normal	vereist 30'	vereist 60'
	ver-eist 30'	ver-eist 60'	Endoth. abr.	vereist 60'	Endothel-abr.
ATP	$<$0,01	$<$0,01	0,61	0,71	$<$ 0,01
ADP	0,02	0,04	0,20	0,60	0,20
ATP/ADP	0,04	0,03	0,93	0,50	0,03
AMP	0,25	0,95	0,40	0,09	0,27

Tab. 15: Auffällige und signifikante Unterschiede für die Adenosinphosphatverbindungen im Hornhautstroma unter den verschiedenen Versuchsbedingungen, bezogen auf Trockengewicht. Die Berechnung erfolgte an unabhängigen Stichproben (α-Werte in %).

Anhang zu Kapitel IV

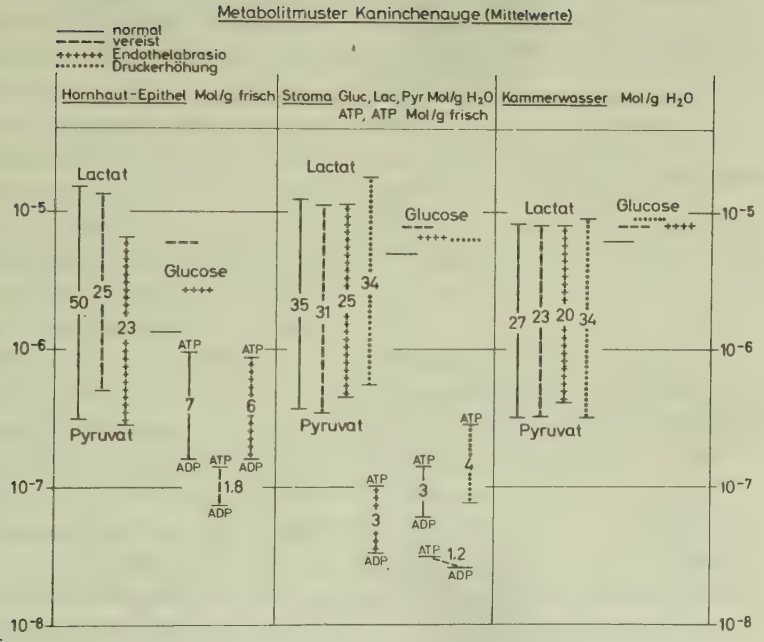

Abb. 1: Metabolitmuster in verschiedenen Kompartimenten des Kaninchenauges unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Die angegebenen Metabolitspiegel entsprechen Mittelwerten aus abhängigen Stichproben. Die Werte sind den Tabellen 2 bis 11 entnommen.

Konzentrationsgefälle für Glucose
zwischen KW, HH-Stroma u. Epithel

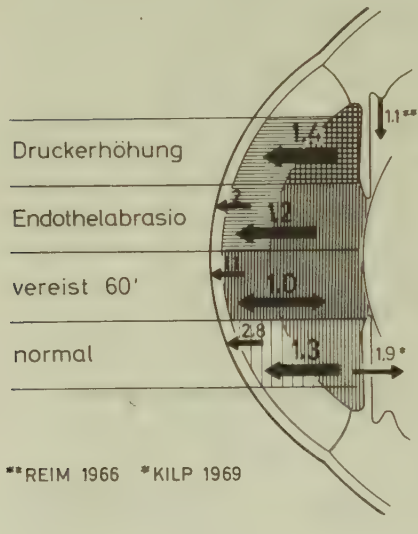

Abb. 2: Konzentrationsgefälle für Glucose zwischen KW, Hornhaut-Stroma und -Epithel unter verschiedenen Versuchsbedingungen.

Konzentrationsgefälle für Lactat
zwischen KW, HH-Stroma u. Epithel

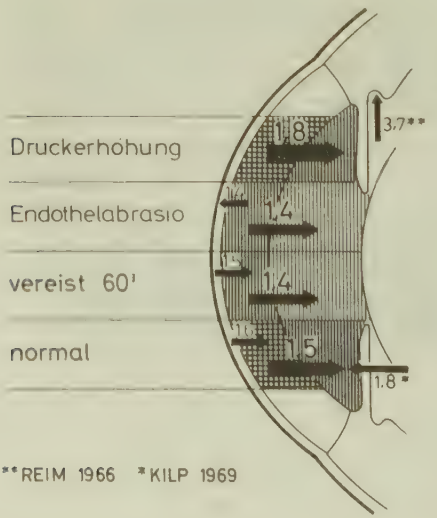

Abb. 3: Konzentrationsgefälle für Lactat zwischen KW, Hornhaut-Stroma und -Epithel unter verschiedenen Versuchsbedingungen.

V. DISKUSSION

Um die Stoffwechselvorgänge in und zwischen den einzelnen Kompartimenten am Kaninchenauge zu verfolgen, stellten wir die Konzentrationen einiger Metabolite der Glycolyse fest. So erfaßten wir im extracellulären Raum die Quantität von Glucose, Lactat und Pyruvat und fertigten entsprechende Metabolitmuster an. Dabei schienen uns besonders die Konzentrationsgradienten zwischen den einzelnen Kompartimenten wichtig und ihre Veränderungen unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Die Konzentrationsunterschiede für die von uns gemessenen Metabolite in benachbarten Kompartimenten des Auges weisen auf trennende Barrieren hin, die aber nach MAURICE, DAVSON, GREEN, MISHIMA und HEDBYS für kleinmolekulare Stoffe und für Glucose durchlässig sein sollen. Falls die Stoffwechselmetabolite sich durch einfache Diffusion zwischen den einzelnen Kompartimenten des Auges bewegen, müßten sie dem Konzentrationsgefälle folgen.
Unsere Ergebnisse sollen nun mithelfen, die Wege festzustellen, die Glucose, Lactat und Pyruvat in den Kompartimenten Hornhautepithel, -Stroma und Kammerwasser nehmen. Unter den verschiedenen Versuchsserien, Vereisung, Endothelabrasio und Augeninnendruckerhöhung, scheint sich eine Änderung der Barrieren zu vollziehen, die sich in der Änderung der Konzentrationsgradienten für die einzelnen Metabolite (Tab. 12 und 13) andeutet (Abb. 2 und 3).
Der jeweilige Quotient Lactat/Pyruvat wurde als Indikator für den Redoxzustand des Gewebes mitdargestellt (Abb. 1).
Im Hornhautepithel und Hornhautstroma stellten wir außerdem Messungen über den Gehalt an Adenosinphosphaten (ATP, ADP, AMP) an, um durch Unterschiede im Gehalt dieser energiereichen intracellulären Verbindungen unter den verschiedenen Versuchsbedingungen auf Zellschädigungen gegenüber dem in-vivo-Zustand zu schließen (Tab. 14 und 15).
Als Indikator für das jeweilige Energiepotential des Zellstoffwechsels im Gewebe ist der Quotient ATP/ADP zu bewerten (BÜCHER).

Mit der Messung der Metabolitkonzentrationen im normalen Hornhautepithel, Hornhautstroma und Kammerwasser setzten wir uns ein Bezugssystem für die Meßergebnisse nach Vereisung, Endothelabrasio und Augeninnendruckerhöhung.

Beim Vergleich unserer Normalwerte mit denen von Voruntersuchern konnten wir, wenn ähnliche experimentelle Bedingungen vorlagen, folgendes feststellen: Im Hornhautepithel liegen bei uns alle gemessenen Metabolitspiegel niedriger als bei REIM und SCHMIDT 1967 und bei REIM, SCHMIDT und MEYER 1965. Wie schon erwähnt, läßt sich das mit einem zu hoch berechneten Trockengewicht des Gewebes erklären, das bei uns mit hoher Wahrscheinlichkeit Metall- und Stromaspuren enthielt, wodurch der Faktor Extraktvolumen/Gewebsgewicht verkleinert wurde.
Im Hornhautstroma liegen unsere Ergebnisse im selben Bereich wie die anderer Experimentatoren (MORLEY und TOTH 1961, DAVSON 1962, REIM und SCHMIDT 1967, REIM, BITTMANN und KILP 1969). Da beim Corneaparenchym im Gegensatz zum Hornhautepithel der extracelluläre Raum über 75 % des gesamten Gewebsvolumens ausmacht, sind dementsprechend die überwiegend intracellulär lokalisierten Adenosinphosphate hier sehr gering. Diese Substanzen stehen, durch ihre Lokalisation bedingt, in benachbarten Geweben nicht in unmittelbarer Beziehung zueinander.

Die Glucose fällt vom KW zum Stroma und weiter zum Epithel hin ab, während das Gefälle für Lactat die umgekehrte Richtung hat, was die Ergebnisse von Voruntersuchern bestätigt. Die Pyruvatkonzentrationen unterscheiden sich in den einzelnen Kompartimenten nicht so auffällig, sie sind aber offensichtlich dem Lactatgefälle gleichgerichtet.
Unsere Kammerwasserwerte entsprechen im wesentlichen den Angaben anderer Autoren (REDDY, KINSEY 1960, DAVSON 1962, REIM, LAX, LICHTE und TURSS 1967, REIM, BITTMANN und KILP 1969).

Nach Vereisen und Wiederauftauen veranschaulicht das entstehende Corneaödem eine Störung im Dehydratationssystem des Gewebes. 60 Minuten nach Kälteapplikation sinkt im Hornhautepithel und -Stroma der ATP-Gehalt auf etwa ein Viertel seines Normalwertes ab, d. h. die Vereisung stört die ATP-Produktion. Wahrscheinlich geschieht dies durch eine Schädigung der Mitochondrien, wobei auch die Spiegel der anderen Adenosinphosphatverbindungen unterhalb des Normalen liegen. Der Abfall des ATP-ADP-Quotienten im Epithel von 7,0 auf 1,8 und im Stroma von 3,0 auf 1,2 steht in Einklang mit der reversiblen Schädigung der energieproduzierenden Stoffwechselleistungen.
Nach in-vivo-Abrasio des Endothels und nach Erhöhung des Augeninnendruckes zeigen die Adenosinphosphate und die ATP-ADP-Quotienten keine wesentliche Abweichung vom Normalen, so daß eine stärkere Schädigung der Zelle nicht anzunehmen ist. Wenn die Adenosinphosphatverbindungen auf Trockengewicht bezogen werden, fallen wiederum in Hornhautepithel und -Stroma erhebliche Verminderungen ihrer Konzentration nach Vereisung auf (Tab. 14 und 15),
60 Minuten nach Vereisung kann man im Hornhautepithel eine Abnahme des Lactats und eine Zunahme des Glucosespiegels beobachten, die als Nachlassen der Glycolyse, gleich geringerem Glucoseverbrauch, zu deuten sind. Der normalerweise hohe Lactat-Pyruvat-Quotient im Corneaepithel, der auf eine hohe glycolytische Aktivität hinweist, sinkt gleichzeitig auf die Hälfte ab.
Im Hornhautstroma fällt besonders der Anstieg der Glucose 60 Minuten nach Vereisung auf, der fast die hohen KW-Werte erreicht; dabei geht der Anstieg der Glucose nach 60 Minuten mit Vermehrung der Hydratation parallel. 30 Minuten nach Vereisung hatte sich der Glucosespiegel noch annähernd normal gehalten und war 22 Stunden nach der Kälteapplikation wieder im Absinken zu Normalwerten hin begriffen. Es scheint, daß die Glucose durch erhöhte Durchlässigkeit des Endothels vermehrt nachströmen konnte. Lactat ist im Stroma nach Vereisung deutlich herabgesetzt. Dieser merk-

liche Abfall des Lactatspiegels läßt an eine Reduktion der glycolytischen Aktivität denken, die solange besteht, wie der Stromalactatspiegel sich dem KW-Lactatspiegel nähert.
Auch im Kammerwasser ist die Glucosekonzentration nach Vereisung, nach Endothelabrasio und bei Erhöhung des Augeninnendruckes erheblich erhöht. Bei diesen Messungen muß daran gedacht werden, daß das KW eine deutliche Trübung zeigte und vermehrt Eiweiß, das leider nicht bestimmt wurde. Es besteht also die Möglichkeit, daß die Blut-KW-Schranke stärker durchlässig geworden ist und somit das KW einem Transsudat des Blutes gleicht. Keine auffälligen Veränderungen zeigten sich dagegen beim KW-Lactat und -Pyruvat nach Vereisung, wie aus Abb. 1 Spalte 3 ersichtlich wird.

Die auffällige Verminderung des Lactats im Hornhautepithel nach Endothelabrasio ist vielleicht als Zeichen einer erleichterten Diffusion des Lactats zum KW hin zu deuten; denn die Energieproduktion in den Epithelzellen war offenbar gut und nicht gestört. Der erhöhte Glucosewert im Epithel weist eventuell auf ein erleichtertes Nachströmen vom KW her hin.
Im Hornhautstroma liegt die Glucose nach Endothelabrasio ebenfalls höher, wahrscheinlich ist dies die Folge des Verschwindens der Barriere zum KW hin. Als sicheres Zeichen, daß keine Einschränkung der glycolytischen Aktivität im Stroma nach Endothelabrasio stattgefunden hat, ist der normale Lactatspiegel zu bewerten.

Nach 10 Minuten dauerndem extrem hohen Augeninnendruck fällt vor allen Dingen die stark erhöhte KW-Glucose auf. Die Deutung könnte vielleicht in der Beobachtung liegen, daß bei etwa verdoppeltem intraokularen Druck vermehrt sogenannte KW-Venen erscheinen (ROHEN); außerdem ist bekannt, daß Glucose sehr schnell die Blut-KW-Schranke durchdringen kann. Im Stroma lassen sich die erhöhten Werte für Lactat, Pyruvat und Glucose vielleicht durch Verände-

rungen des extracellulären Raums erklären auf Grund von physikalisch-chemischen Umbildungen während der Dauer der Druckerhöhung. Dazu könnte die durch den Druck erzeugte arteficielle vis-a-tergo eine Störung der Diffusion der extracellulären Metabolite im Stroma mitverursachen. Insgesamt gesehen sind die Ergebnisse nach Augeninnendruckerhöhung noch zu uneinheitlich und nicht umfangreich genug, um endgültige Schlüsse über die Abhängigkeit zwischen Druckerhöhung und Stoffwechselvorgängen zu ziehen, was weiteren Versuchen vorbehalten bleiben muß.

Nach unseren Ergebnissen glauben wir feststellen zu können, daß bei den Tierexperimenten nach Vereisung der 30-Min-Wert als Übergangsstadium, der 60-Min-Wert als Beginn einer Gleichgewichtseinstellung, also als das wesentliche Ergebnis der Vereisung, bewertet werden kann. So stellt sich das Diffusionsgleichgewicht für Glucose zwischen KW und Stroma erst 60 Minuten nach Vereisung ein durch eine weitgehende Aufhebung der Diffusionsbarriere im Endothel; während nach 30 Minuten der KW-Stroma-Gradient für Glucose sehr hoch liegt (2,0), und der Hydratationswert zu diesem Zeitpunkt nur 3,8 erreicht hat bei gleichzeitig auffällig niedrigem Lactatwert. Das zeigt, daß auch für Lactat ein Ausgleich zwischen Stroma und KW 30 Minuten nach Vereisung noch nicht eingetreten ist, der Gradient beträgt abweichend vom Normalen 1,12. Dagegen läßt nach 60 Minuten der Gradient KW/Stroma auch für Lactat einen Ausgleich zwischen beiden Kompartimenten erkennen.

Die Änderung der Konzentrationsgradienten unter den verschiedenen Versuchsbedingungen (Tab. 12, 13, Abb. 2,3) sind bei unseren Experimenten von besonderer Bedeutung, da sie am gleichen Auge gewonnen wurden und als abhängige Stichproben statistisch behandelt werden können.
Bei Betrachtung der Ergebnisse deutet sich eine Änderung der Barrieren nach Vereisung und nach Endothelabrasio an. Die Verwandtschaft dieser Ergebnisse basiert wohl auf der bekannten Empfindlichkeit des Endothels für den Vorgang

des Einfrierens (CHI und KELMAN).
Die Erhöhung der Glucosespiegel im KW läßt allerdings die Änderungen der Stromawerte etwas fragwürdig erscheinen, möglicherweise ist doch der Diffusionswiderstand durch die Stromasubstanz von erheblicher Bedeutung. Wahrscheinlich muß man zwischen initialen Veränderungen unterscheiden, bei denen die KW-Glucose so stark ansteigt. Auch demnach sind die 30-Min-Werte niedriger in der Interpretation einzustufen als die 60-Min-Werte nach Vereisung, bei denen sich ein neues Gleichgewicht einzustellen scheint oder schon eingestellt hat. Hier zeigt sich dann auch deutlich ein Ausgleich der Konzentrationsgradienten, der als erhöhte Durchlässigkeit der Endothelbarriere gedeutet werden muß. Elektronenmikroskopische Beobachtungen zu diesem Prozess stellen die Stereo-Scan-Bilder der Dissertationsarbeit G. FOERSTER (Marburg, 1970) dar.
Neben dieser verstärkten Diffusion durch Barrierenzerstörung könnte man als weitere Ursache für die erhöhten Glucosewerte im Stroma einen verminderten Glucoseverbrauch ansehen; d.h. es käme zu einer Anhäufung im extracellulären Raum des Hornhautparenchyms. Diese Erklärung stünde auch im Einklang mit dem deutlich erniedrigten Lactatspiegel in der Cornea.
Für die Vorstellung, daß die 30-Min-Ergebnisse ein ausgesprochenes Übergangsstadium darstellen, spricht auch der statistisch signifikante Unterschied zwischen den 30- und 60-Min-Werten für Lactat, Glucose und den Lactat-Pyruvat-Quotienten im Stroma und für die Adenosinphosphate im Epithel.

Bezüglich der Behandlung von Keratitiden durch Kryotherapie können wir aus unseren Versuchsergebnissen schließen, daß nach kurzer lokaler Vereisung und Wiederauftauen die Energieproduktion in der Cornea gestört ist. Diese Reduktion behindert höchstwahrscheinlich den Reduplikationsprozess von Viren, der ja vom Metabolismus der Wirtszelle abhängig ist. Die Virus-Reproduktion wird vermutlich so lange eingeschränkt, wie der ATP/ADP-Quotient im Gewebe niedrig ist.

Der Heileffekt der Kryotherapie bei Herpes simplex Keratitis basiert somit auf diesen von uns experimentell nachvollzogenen Stoffwechselalterationen im Hornhautgewebe, wie auch BELLOWS 1969 schon vermutete. Die erfolgreiche Kryobehandlung von trophischen Hornhautgeschwüren (STRAUB 1964, 1965) läßt vermuten, daß in diesen Fällen eine Herpesvirus-Infektion mitbeteiligt war. Bakterielle und mykotischen Infektionen der Cornea konnten bisher jedoch noch nicht durch Kryotherapie beeinflußt werden. So nehmen wir an, daß nach Vereisung und Wiederauftauen das Wachstum der vom energieliefernden Zellstoffwechsel unabhängigen Organismen nicht gestört wird. Diese Vermutung finden wir durch unsere Versuchsergebnisse bestätigt, da wir nach Vereisung und Wiederauftauen in der Hornhaut einen hohen, für die Ernährung dieser Organismen ausreichenden Glucosespiegel vorfanden. Demzufolge ist eine lokale Antibiotikatherapie nach Kryobehandlung unbedingt angezeigt, wie auch schon andere Experimentatoren vorschlugen (TOST, FUHRMEISTER, SCHULZE 1965).

Obwohl nach dem Vereisen ein Hornhautödem auftrat, konnte keine Vaskularisation der Cornea beobachtet werden. Hohe Lactatspiegel in der Cornea sollen nach IMRE und PAL (1968) die Gefäßbildung auslösen. Deshalb glauben wir annehmen zu können, daß der niedrige Lactatwert im Stroma nach Vereisung einer der Faktoren ist, der das Einsprossen von Blutgefäßen in das ödematöse Gewebe verhindert.

Da die durch unsere Versuchstechnik hervorgerufenen biochemischen Veränderungen im Hornhautgewebe reversibel sind (Dissertationsarbeit U. LIPP, Marburg 1969), ist das Risiko einer Kryobehandlung der Cornea niedrig, wenn bakterielle und mykotische Infektionen gleichzeitig unter Kontrolle gehalten werden.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Am Tierversuch führten wir in den drei Kompartimenten des Auges, Hornhautepithel, Hornhautstroma und Kammerwasser, Messungen von Metabolitkonzentrationen durch. Die eng mit der glycolytischen Stoffwechselleistung des Gewebes gekoppelten extracellulären Metabolite Glucose, Lactat und Pyruvat interessierten besonders hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Verteilung in den benachbarten Augenabschnitten. Über die Konzentrationsgefälle, die sich in den Konzentrationsgradienten zwischen den Kompartimenten ausdrücken, konnten wir Aussagen über die mögliche Richtung der Stoffbewegung und über Permeabilitätsbarrieren zwischen den Kompartimenten machen.
Durch Metabolitanalysen nach Hornhautvereisung und verschieden langer Dauer des Wiederauftauens sowie nach Endothelabrasio in vivo und nach intraokularer Druckerhöhung deckten wir Alterationen der Diffusionsbarrieren auf, was sich durch Änderung der Konzentrationsgradienten für die niedermolekularen Stoffe Glucose, Lactat und Pyruvat manifestierte. Dabei erwiesen sich die Resultate 60 Minuten nach Vereisung als wesentlich durch eine Neueinstellung der Gleichgewichte zwischen den einzelnen Kompartimenten, während die 30-Min-Werte als initiales Übergangsstadium zu bewerten sind. Die beiden Versuchsreihen, Vereisen mit 60 Minuten Wiederauftauzeit und in vivo Endothelabrasio zeigten sehr ähnliche Ergebnisse bezüglich der extracellulären Metabolite, so daß wohl in beiden Fällen eine Schädigung der Diffusionsbarriere im Endothel anzunehmen ist.
Als Bezugsmaßstab dienten unsere Versuche an normalen Augen, womit wir gleichzeitig die gegenläufige Diffusion von Glucose und von Lactat sowie Pyruvat zwischen Epithel, Stroma und Kammerwasser bestätigten.
Als wichtigstes Ergebnis dieser Arbeit darf man demnach die Werte der Konzentrationsgradienten und die Änderung der Konzentrationsgradienten unter den verschiedenen Versuchsbedingungen ansehen, die auf statistisch gesichertem Material beruhen.

Außerdem untersuchten wir im Hornhautepithel und -Stroma den Gehalt an Adenosinphosphaten, wobei uns das Verhältnis ATP/ADP im Hinblick auf den jeweiligen Energiestatus unter den verschiedenen Versuchsbedingungen besonders wichtig war. Nach Vereisung fiel dieser Quotient im Epithel von 7,0 auf 1,8 und im Stroma von 3,0 auf 1,2 ab.
Bezüglich der Adenosinphosphate im Hornhautepithel zeigten sich geringe Abweichungen von den Angaben anderer Autoren, was wir auf unterschiedliche Experimentiertechnik zurückführen. Es kommt aber auch in unseren Versuchsergebnissen klar zum Ausdruck, daß sowohl das Epithel als auch das Stroma durch die Vereisung an Funktionstüchtigkeit einbüßten, indem ihr energieliefernder Stoffwechsel empfindlich gestört wurde. Diese biochemischen Veränderungen im Gewebe nach Vereisung und Wiederauftauen setzten wir in kausale Beziehung zu den Erfolgen der Kryotherapie an der Cornea.
Nach Endothelabrasio verhielten sich die Adenosinphosphate im Hornhautepithel und -Stroma normal; es liegt also hier keine der Kälteapplikation vergleichbare Zellschädigung vor. Auch nach temporärer Augeninnendruckerhöhung war die Energieproduktion in den Stromazellen nicht gestört.
Die Ergebnisse der Druckversuchsserie fordern aber auf Grund technischer und numerischer Unvollkommenheit noch weitere Klärung.

VII. METHODISCHER ANHANG

1. Abkürzungen

ADP	Adenosinphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BTS	Brenztraubensäure = Pyruvat
EDTA	Äthylendiaminotetraessigsäure
G	Glucose
G-6-PDH	Glucose-6-Phosphatdehydrogenase
HK	Hexokinase
HH	Hornhaut
HHE	Hornhautepithel
HHStr.	Hornhautstroma
KW	Kammerwasser
L	Lactat
MK	Myokinase
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	reduziertes NAD
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
nMol	10^{-9} Mol
P	Pyruvat
PEP	Phosphoenol-Brenztraubensäure
PK	Pyruvatkinase
TRAP	Triäthanolamin-Puffer

Testnummer	Glucose	Lactat	Pyruvat	L/P	ATP	ADP	ATP/ADP	AMP	Σ AP	F
V 2		4749	371	12,8	834	191,4	4,4			99,0
V 3	2508	19122	313	61,0	746	323,0	2,3	130	1199,0	134,0
V 4	430	13700	180	75,0	334	43,4	7,7	45	422,9	52,0
V 5	620		213		212					84,0
V 6	585	36300	836	43,4	3529	303,0	11,7	515	4347,0	360,0
V 7			315		755	72,0	10,5	71	898,0	66,0
V 8	999	8855	163	54,5	565	82,8	6,8	12	659,8	77,9
V 9	1252	8560	155	55,2	1140	176,0	6,5	87	1403,0	73,2
V 10	1259	10175	200	50,9	350	53,3	6,6	19	422,3	82,8
V 19	2805	18100	391	46,3	1017	200,0	5,1	270	1487,0	186,0

Tab. 16: Normalversuche; Hornhautepithel nach Frierstop.
in nMol/g Frischgewicht.
F = Faktor (Extraktvolumen/Gewebsgewicht)

Testnummer	Glucose	Lactat	Pyruvat	L/P	ATP	ADP	ATP/ADP	AMP	∑ AP	Zeit	F
V 11	2651	22000	738	29,8	361	278	1,3	98,5	737,5	30'	117
V 12	2648	23020	530	43,4	245	172	1,4	42,5	459,5	30'	119
V 13		14630	318	46,0	254	324	0,8	105,0	683,0	30'	150
V 14	2215		386		189	111	1,7			60'	73,4
V 15		16350	498	32,8	119,0	63	1,8	15,9	197,9	60'	88,7
V 16	9890	15700	622	25,2	95,9	67	1,4	103,0	266,0	60'	93,2
V 17	6920	9715	549	16,4	113,0	59	1,9	309,0	481,0	60'	82,7
V 18	4430	11150	460	24,2	169,0	71	2,4	120,5	360,5	60'	82,8

Tab. 17: Hornhautepithel nach Vereisung und Wiederauftauen; Frierstop-Epithel. In nMol/g Frischgewicht

Testnummer	Glucose	Lactat	Pyruvat	L/P	ATP	ADP	ATP/ADP	AMP	∑AP	Zeit	F
V 25	3410	6320	305	20,7				20,7		60'	143,4
V 26	3915	9300	309	30,1	775	57,0	13,6			60'	51,7
V 27	1920	6030	227	26,6	996	69,0	14,4	35,0	1100,0	60'	48,0
V 28	2300	5680	369	15,4	1060	54,0	19,0	54,4	1168,4	60'	75,0
V 29	2025	5030	210	24,0	617	54,0	11,4	27,0	698,0	60'	50,0

Tab. 18: Hornhautepithel nach Endothelabrasio.
Frierstop-Epithel.
In nMol/g Frischgewicht.

Testnummer		Glucose	Lactat	Pyruvat	L/P	ATP	ADP	ATP/ADP	AMP	ΣAP	E	Q
V 1	RA	558	7026	197,8	35,5	304,0	86,7	3,5			91,3	4,5
V 2	RA			213,0							65,3	4,6
	LA					106,1					69,5	4,7
V 3	RA	3082	17375	862,0	20,0	186,0	42,0	4,4			77,7	3,9
	LA	2378	19911	600,0	33,2	86,0	44,0	1,9			80,8	4,2
V 4	RA	12201	13371	380,9	35,0						76,5	3,5
	LA	14738	16900	345,4	49,6						93,5	3,7
V 5	LA	1860	7504	211,0	35,6	76,1	50,6	1,5	26,1	153,1	26,3	3,3
V 6	RA	3579	15911	557,0	28,6	130,0					36,2	4,1
	LA	4106	11483	324,0	35,4	117,0	26,8	4,4	21,6	165,6	41,2	5,2
V 7	RA	4131	10389	286,0	38,8	126,0	19,8	6,4	14,5	180,5	45,9	4,8
	LA	6294	16809	394,0	42,7	269,0	57,8	4,7	18,1	345,1	41,8	4,3
V 8	RA	6734	7884	318,0	24,8	150,0	78,0	2,0	24,6	252,6	33,5	4,6
	LA	4140	11780	321,0	36,7	194,0	161,0	1,2	70,5	425,0	34,2	4,0
V 9	RA	3201	9609	297,0	32,4	99,0	36,2	1,6	73,5	164,7	41,9	3,9
	LA	2959	10301	562,0	18,3	46,0					34,8	3,9
V 10	LA	4859	11382	336,0	33,9	114,0	65,0	1,8			54,6	4,3
V 19	RA		9310	171,0	54,4	122,0	44,3	2,8	48,0	213,3	29,4	4,9
	LA	2731	9273	210,0	44,2	210,0					32,0	4,7

Tab. 19: Hornhautstroma; Normalversuche. RA = rechtes Auge; LA = linkes Auge.
Glucose, Lactat, Pyruvat in nMol/g H_2O; Adenosinphosphate in nMol/g frisch.

Testnummer		Glucose	Lactat	Pyruvat	L/P	ATP	ADP	ATP/ADP	AMP	Σ AP	P	Q	Zeit
V 11	RA	1988	4472	293,0	15,3	27,3	31,2	0,9	15,6	73,9	29,0	4,8	30'
	LA	4744	4638	389,0	12,0	23,6	32,6	0,8	26,1	82,2	37,0	4,0	30'
V 12	RA	4919	8515	308,0	27,6	32,8	30,8	1,1	15,5	79,1	35,4	4,5	30'
	LA	4988	9771	395,0	24,8	23,9	40,5	0,6	0,0	64,4	37,3	4,8	30'
V 13	RA	3422	5306	205,0	25,9	38,4	13,9	2,7			32,2	5,4	30'
	LA	4983	8178	360,0	24,8	37,4	15,1	2,5			35,2	4,6	30'
V 14	RA			327,0		48,0	38,5	1,2			22,6	6,4	60'
	LA	8424	13950	411,0	33,9	42,6	18,5	2,3			20,2	6,4	60'
V 15	RA	9867	15111	402,0	37,6	60,0	0,0				42,4	5,3	60'
	LA	11071	11755	302,0	39,0	46,5	0,0				36,3	5,1	60'
V 16	RA	8222	9683	332,0	29,2	15,0	8,6	1,7	21,4	45,0	32,9	6,9	60'
	LA	7804	7273	408,0	17,8	35,3	38,6	1,0	21,6	97,5	33,1	5,2	60'
V 17	RA	8173	7450	328,0	22,7	40,0	20,1	1,9	16,5	76,6	31,1	6,2	60'
	LA	8260	8143	418,0	22,2	29,5	13,0	2,3	19,4	61,9	30,0	6,2	60'
V 18	RA	7961	12648	276,0	38,4	54,1	16,5	3,3	43,3	113,9	31,8	5,1	60'
	LA	5831	7416	277,0	28,8	34,6	17,5	2,0			27,1	5,1	60'
V 20	RA	5220	11364			49,7					32,2	6,0	60'
	LA	4800	11029	278,0	42,6	160,0	69,5	2,3	49,0	278,5	37,7	4,9	60'
V 22	RA	6250	4370	250,0	16,9						24,5	11,8	22 Std.
	LA	6358	3721	229,0	16,3						26,0	11,4	22 Std.
V 23	RA	4765	14340	695,0	20,6	39,0					22,9	10,7	22 Std.
	LA	3912	3911	183,0	21,2	12,7					17,9	9,5	22 Std.

Tab. 20: Hornhautstroma; nach Vereisung und Wiederauftauen.
RA = rechtes Auge; LA = linkes Auge.
Glucose, Lactat, Pyruvat in nMol/g H_2O;
Adenosinphosphate in nMol/g frisch.

Testnummer		Glucose	Lactat	Pyruvat	L/P	ATP	ADP	ATP/ADP	AMP	≷ AP	F	Q	Zeit
V 21	RA	7489	7613	337	22,6	45,7	25,4	1,8			23,5	5,8	60'
	LA	8579	7552	400	18,9	55,5	35,2	1,6	45,0	135,2	24,8	5,8	60'
V 25	RA	5596	12884	484	26,6	143,6	31,6	4,5	28,6	203,8	29,3	4,9	60'
	LA	5904	10348	345	30,0	134,0	35,4	3,8	41,5	210,9	27,4	5,6	60'
V 26	RA	7006	8750	401	21,8	76,7	21,8	3,5	22,0	120,5	25,7	7,0	60'
	LA	8823	12400	703	17,6	78,0	26,0	3,0			30,5	6,2	60'
V 27	RA	6830	14853	488	30,4						36,5	6,9	60'
	LA		9051	341	26,5						19,7	6,7	60'
V 28	RA	5520	12572	395	31,8	74,0	36,9	2,1	39,0	149,9	34,2	6,9	60'
	LA	7564	12409	540	23,0	78,5	33,2	2,4	35,6	147,3	30,7	6,5	60'
V 29	RA	3960	9075	413	22,0						13,9	6,6	60'
	LA	4121	13632	402	33,9	210,0	52,5	4,0	23,5	286,0	30,4	4,9	60'

Tab. 21: Hornhautstroma nach Endothelabrasio;
RA = rechtes Auge; LA = linkes Auge.
Glucose, Lactat, Pyruvat in nMol/g H_2O
Adenosinphosphate in nMol/g frisch.

Testnummer		Glucose	Lactat	Pyruvat	L/P	ATP	ADP	ATP/ADP	AMP	ΣAP	F	Q	Zeit
V 30	RA	11202	15398	430	35,8	280,0	58,0	4,8	41,0	379,0	54,4	3,9	10'
	LA	8668	13557	239	56,7						70,0	6,2	10'
V 31	RA	5026	16135	496	32,5	400,0	112,0	3,6	135,0	647,0	62,7	4,1	10'
	LA	4733	19200	587	32,7	160,0	73,3	2,2	29,6	262,9	68,1	4,0	10'
V 32	RA	4607	15659	427	36,7	450,0	91,5	4,9	70,0	611,5	70,8	4,4	10'
V 33	RA	4626	14177	537	26,4	340,0	67,0	5,1	78,5	485,0	51,4	4,3	10'
	LA	5502	26848	1078	24,9	260,0			84,0		55,3	4,1	10'
V 34	RA	4894	16929	489	34,6	183,0	53,6	3,5	34,2	273,8	62,9	4,1	10'
	LA	5381	16275.	669	24,3	220,0			104,0		56,7	4,2	10'

Tab. 22: Hornhautstroma nach Augeninnendruckerhöhung.
RA = rechtes Auge; LA = linkes Auge.
Glucose, Lactat, Pyruvat in nMol/g H_2O.
Adenosinphosphate in nMol/g frisch.

Testnummer		Glucose	Lactat	Pyruvat	L/P	F
V 1	RA	4370	6565	196	33,5	12,0
	LA	6370	8200	250	32,8	11,5
V 2	RA	7080	14400	340	42,4	12,2
	LA	9725	19430	485	40,1	13,3
V 4	RA	4280	5900	266	22,2	16,8
	LA	4000	5950	284	21,0	14,8
V 5	RA					
	LA	1880	3000	107	28,0	8,6
V 6	RA	6460	7850	320	24,5	11,6
	LA	6380	8880	170	52,0	14,0
V 7	RA	7070	7360	330	22,3	11,6
	LA	6800	8220	320	25,7	12,0
V 9	RA	6209	9170	402	22,8	19,0
	LA	5975	7200	372	19,4	12,8
V 10	RA	7600	7300	450	16,2	12,4
	LA	6930	7340	407	18,0	14,1
V 19	RA	5490	5720	361	15,8	12,6
	LA	6020	6025	384	15,7	13,5

Tab. 23: Kammerwasser; Normalversuch.
Glucose, Lactat, Pyruvat in nMol/g H_2O.

Testnummer		Glucose	Lactat	Pyruvat	L/P	F	Zeit
V 11	RA	8300	7700	352	21,9	12,8	30'
	LA	7960	7745	376	20,6	12,3	30'
V 12	RA	7250	7000	394	17,8	12,1	30'
	LA	7004	6750	285	23,7	11,0	30'
V 13	RA	10300	8950	320	28,0	11,3	30'
	LA	9500	8310	350	23,7	11,0	30'
V 14	RA	6400	10710	368	29,1	11,4	60'
	LA	7450	11240	364	30,9	11,9	60'
V 15	RA	9550	11470	400	28,7	12,5	60'
	LA	10650	10300	372	27,7	12,7	60'
V 16	RA	7450	6720	366	18,4	12,9	60'
	LA	5650	6180	298	20,7	11,5	60'
V 17	RA	9130	5710	312	18,3	11,0	60'
	LA	9500	6440	352	18,3	11,8	60'
V 18	RA	6400	4800	258	18,6	11,0	60'
	LA	6770	5440	243	22,4	12,1	60'
V 20	RA	7430	6710	253	26,5	11,3	60'
	LA	7380	5000	232	21,6	11,4	60'
V 22	RA	8150	3560	298	11,9	11,5	22 Std.
	LA	7700	3000	230	13,0	11,5	22 Std.
V 23	RA	5000	3220	195	16,5	9,0	22 Std.
	LA	6170	3300	220	15,0	9,7	22 Std.

Tab. 24: Kammerwasser; nach Vereisung und Wiederauftauen.
Glucose, Lactat, Pyruvat in n'Mol/g H_2O

Testnummer		Glucose	Lactat	Pyruvat	L/P	F	Zeit
V 21	RA	7580	5100	322	15,8	16,0	60'
	LA	9800	6450	390	16,5	18,4	60'
V 25	RA	9050	6050	420	14,4	15,4	60'
	LA	9800	7500	447	16,8	21,0	60'
V 26	RA	9030	8750	460	19,0	47,4	60'
	LA	9270	8625	532	16,2	20,3	60'
V 27	RA						
	LA	6351	8700	293	29,7	15,0	60'
V 28	RA	6800	11900	420	28,3	43,1	60'
	LA						
V 29	RA	4680	9120	410	22,3	12,2	60'
	LA	600	6830	421	16,2	12,9	60'

Tab. 25: Kammerwasser; nach Endothelabrasio.
Glucose, Lactat, Pyruvat in nMol/g H_2O

Testnummer		Glucose	Lactat	Pyruvat	L/P	F	Zeit
V 30	RA	12790	9480	467	20,3	8,2	10'
	LA	12940	9230	288	32,0	8,1	10'
V 31	RA						
	LA	5550	10580	176	60,1	10,5	10'
V 33	RA						
	LA	7120	9750	253	38,5	7,9	10'
V 34	RA	6470	9005	321	28,1	9,6	10'
	LA	7160	10380	405	25,6	11,4	10'

Tab. 26: Kammerwasser; nach Erhöhung des Augeninnendruckes.
Glucose, Lactat, Pyruvat in nMol/g H_2O.

3. Literaturverzeichnis

AONO, H.: Acta soc.ophthalm.jap. 65, 941 (1961)

BAUM, J.L.: A histochemical study of corneal respiratory enzymes.
Arch. Ophthal. Chicago 7o, 59 (1963)

BELLOWS, J.G.: Low temperature treatment of herpes simplex keratitis.
Eye, Ear, Nose Thr.Monthly,45, 67 (1966)

BELLOWS, J.G.: Cryotherapy of Ocular Diseases.
J.B. Lippincott Company. Philadelphia-Toronto (1966)

BELLOWS, J.G.: Molekuläres Vorgehen zum Mechanismus und zur Behandlung der Herpes virus Keratitis.
Klin.Mbl.Augenheilk. 155, 696 (1969)

BENGT, HEDBYS, B.O. and S. MISHIMA: Flow of water in the corneal stroma.
Exp. Eye Res. 1, 262 (1962)

BERARDINIS, de, E., O. TIERI: Rapport entreles concentrations de l'acide lactique dans l'humour aqueuse et dans le plasma.
Ann. Oculist. 194/5, 411 (1971)

BIETTI, G.B.: Vergleichende Bewertung der Diathermie und der Kryoapplikation bei der Behandlung der Netzhautablösung.
Klin.Mbl.Augenheilk. 152, 181 (1968)

BITTMANN, K.: Über Metabolitspiegel im Corneaparenchym und in der Konjunctiva unter verschiedenen experimentellen Bedingungen.
Inaugural Dissertation, Marburg, 197o

BOCK, R.H., A.E. MAUMENEE: Corneal fluid metabolism; experiments and observations.
Arch. of Ophthal. 5o, 282 (1953)

BÜCHER, Th., W. LUH und D. PETTE:
Einfache und zusammengesetzte optische Tests mit Pyridinnucleotiden.
In: Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse, 1o. Aufl. Bd. VI, Teil A, S. 292
Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg-New York 1964

BÜCHER, Th. u. M. KLINGENBERG:
Wege des Wasserstoffs in der lebendigen Organisation.
Angew.Chem. 7o, 552 (1958)

CHI, H.H. and C.D. KELMAN:
Effect of freezing in ocular tissues.
Amer. J. Ophthal. 61, 63o (1966)

COGAN, D.G., V.E. KINSEY:
The cornea. I Transfer of water and sodium chloride by osmosis and diffusion through the excised cornea. II Transfer of water and sodium chloride by hydrostatic pressure through the excised cornea.
Arch. Ophthal. 27, 466, 696 (1942)

CORVIN, M.E., R.L. COPELAND and S. BIRNBAUM:
Cyrogenic therapy in the treatment of experimental herpes simplex keratitis.
Amer. J. Ophthal. 63, 399 (1967)

DAVSON, H. and C.B. WELD:
Studies on the aqueous humour.
Amer. J. Physiol 134, (1941)

DAVSON, H.: Physiology of the ocular and cerebrospinal fluids.
Little Brown, Boston (1956)

DAVSON, H.: The eye: Vegetative physiology and biochemistry.
Academic Press, New York - London (1969)

De ROETTH, A.: Glycolytic activity of the cornea.
Arch. Ophthal., N.Y. 45, 139 (1951)

DEUTSCHMANN, R.: Klin.Mbl.Augenheilk. 94, 249 (1935)

DIKSTEIN, S. and D.M. MAURICE:
Zitat aus The cornea and sclera, S. 489 in H. DAVSON: The Eye (1969)
Academic Press N.Y. and London

DOHLMAN, C.H., HEDBYS, B.O. and S. MISHIMA:
The swelling pressure of the corneal stroma.
Invest. Ophthal. St. Louis, Vol. I, No. 2, 156 (1962)

DONALDSON, D.D.: A new instrument for the measurement of corneal thickness.
Arch. Ophthal. Chicago 76, 25 (1966)

DONN, A., D.M. MAURICE and N.L. MILLS:
Studie on the living cornea in vitro. The active transport of sodium across the epithelium.
Arch. Ophthal. N.Y. 62, 741 (1959)

DONN, A.: Annual Review (1965).
Arch. Ophthal. 75, 261 (1966)

EHLERS, N., D. RIISE:
On corneal thickness and intraocular pressure.
Acta Ophthal. 45, 8o9 (1967)

FATT, I.: Dynamics of water transport in the corneal stroma.
Exp. Eye Res. 7, 4o2 (1968)

FORLANI, D., G. TIBERIO and L. NEGRONI:
Die Kryotherapie in der Ophthalmologie.
Bücherei des Augenarztes 55. Heft, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (197o)

GIARDINI, A. and J.R.E. ROBERTS:
Concentration of glucose and total chloride in tears.
Brit. J. Ophthal. 34, 737 (195o)

GOLDMAN, J.N. and G.B. BENEDEK:
The relationship between morphology and transparency in the nonswelling corneal stroma of the shark.
Invest. Ophthal. 6, 574 (1968)

GREEN, K.: Ion transport across the isolated rabbit cornea.
Exp. Eye Res. 5, 315, 1o6 (1966)

HALE, P.N. and D.M. MAURICE:
Sugar transport across the cornea endothelium.
Exp. Eye Res. 8, 2o5 (1969)

HANNA, C. and J.E. OBRIEN:
Cell production and migration in the epithelial layer of the cornea.
Arch. Ophthal. N.Y. 64, 536 (196o)

HARRIS, J.E., L. GRUBER:
The hydration of the cornea.
Amer. J. Ophthal. 44, 262 (1957)

HARRIS, J.E.: The physiologic control of corneal hydration.
Amer. J. Ophthal. 44, 262 (1957)

HAYE, C.: La cryochirurgie.
Arch. Ophtal. Paris 25, 357 (1965)

HEDBYS, B.O., S. MISHIMA, D.M. MAURICE:
The imbibition pressure of the corneal stroma.
Exp. Eye Res. 2, 99 (1963)

HERRMANN, H. and F. HICKMAN:
Exploratory studies on cornea metabolism.
Bull. Johns.Hopk.Hosp. 82, 225 (1948)
Zitat aus Biochemistry of the eye, ed. A. Pirie and R. van Heyningen, S. 151

HOHORST, H.J., F.H. KREUTZ and Th. BÜCHER:
Über Metabolitgehalte und Metabolitkonzentrationen in der Leber der Ratte.
Biochem.Z. 332, 118 (1959)

HOHORST, H.J., F.H. KREUTZ and M. REIM:
Steady state equilibria of some DPN-linked reactions and the oxydation/reduction state of the DPN-DPNH system in the cytoplasmatic compartment of liver cells in vivo.
Biochem.Biophys.Res.Comm. 4, 159 (1961)

HOHORST, H.J., M. REIM and H. BARTELS:
Studies on the creatine kinase equilibrium in muscle and the significance of ATP and ADP levels.
Biochem.Biophys. Res. 7, 142 (1962)

IMRE, G. and M. PAL:
Hornhautquellungen ohne Vaskularisation.
Szemészet 1o5, 81 (1968)

JAKUS, M.A.: The fine structure of the human cornea. In: The structure of the eye, ed. G.K. Smelser, S. 343.
Academic Press, London, New York, 1961

KAUFMANN, H.E.: Cryotherapy of the keratitis herpetica.
II. Congress on Cryosurgery, Miami Beach, Fla. 1968

KAYE, J., G.D. PAPPAS and A. DONN:
An electron microscope study of the rabbit corneal endothelium in relation to its uptake and transport of colloidal particles.
Anat. R. 139, 244 (1961)

KAYE, J. and G.D. PAPPAS:
Studies on the cornea.
Fine structure of the rabbit cornea and the uptake and transport of colloidal particles by the cornea in vivo.
J.Cell.Biol. 12, 457 (1962)

KELMAN, C. and J. COOPER:
EENT Monthly 42, 42 (1963)

KELMAN, C.D.: Atlas of cryosurgical techniques in ophthalmology.
The C.V. Mosby Company, Saint Louis (1966)

KIKKAWA, Y.: Corneal potential studies on excised cornea.
Exp. Eye Res. 5, 31 (1966)

KILP, H.: Über die Konzentrationen einiger Metabolite in den vorderen Augenabschnitten im Modellversuch bei Kaninchen.
Inaugural Dissertation, Marburg 1971

KINSEY, N.E.: Comparative chemistry of aqueous humour in posterior and anterior chamber of rabbit eye.
Arch. Ophthal. 5o, 4o1 (1953)

KRWAWICZ, T.: Cryogenic treatment of the herpes simplex keratitis.
Brit. J. Ophthal. 49, 37 (1965)

LANGHAM, M.: The cornea.
The John Hopkins Press, Baltimore - London (1967)

LINCOFF, H.A. and J.M. McLEAN: Cryosurgery in treating retinal detachement and other eye disorders.
Brit. J. Ophthal. 49, 337 (1965)

MATTHÄUS, W.: Thermographische Untersuchungen bei der Kryoextraktion der Linse.
Klin. Mbl. Augenheilk. 146, 24 (1965)

MAUMENEE, A.E. and W. KORNBLUETH: Degeneration of the cornea stroma cells.
Amer. J. Ophthal. 31, 699 (1948)

MAURICE, D.M.: The permeability to sodium ions of the living rabbit cornea.
J. of Physiol. 367 (1951)

MAURICE, D.M. and A. GIARDINI: Swelling of the cornea in vivo after the destruction of its limiting layers.
Brit. J. Ophthal. 35, 791 (1951)

MAURICE, D.M. and M. LANGHAM: Glycolysis in the cornea of the rabbit.
J. Physiol. 126, 396 (1954)

MAURICE, D.M.: The movement of fluorescein and water in the cornea.
Amer. J. Ophthal. 49, 1o11 (196o)

MEYERHOF, O., K. LOHMANN: Über die Atmung und den Kohlenhydratumsatz tierischer Gewebe.
Biochem. Z. 171, 381 (1926)

MISHIMA, S., B.O. HEDBYS:
The permeability of the corneal epithelium and endothelium to water.
Exp. Eye Res. 6, 1o (1967)

MISHIMA, S. and T. KUDO:
In vitro incubation of rabbit cornea.
Invest. Ophthal. 6, 329 (1967)

MISHIMA, S., S.M. TRENBERTH:
Permeability of the corneal endothelium to nonelectrolytes.
Invest. Ophthal. 34, (1968)

MORLEY, N.H. and A. TOTH:
Oxydized pyridine nucleotides and lactic acid in the cornea tissue of rabbit.
Canad.J. Bioch. 39, 477 (1961)

NAYLOR, E.J.: Polarized light studies of corneal structure.
Brit. J. Ophthal. 38, 77 (1953)

OTORI, I. and K. GREEN:
Studies on Corneal Physiology in vitro.
Exp. Eye Res. 9, 268 (197o)

PAUFIQUE, L.: Traitement des kératites herpétiques aigues par la cryothérapie.
Bull. Soc. Ophtal. France 68, 481 (1968)

PAYRAU, P., Y. POULIQUEN, J.P. FAURE et G. OFFRET:
La Transparence de la Cornée. Les Mécanismes de ses Altérations.
Masson et Cie., Paris (1967)

PEDLER, C.: The fine structure of corneal epithelium.
Exp. Eye Res. 1, 286 (1962)

POHJOLA, S.: The glucose content of the aqueous humour in man.
Acta Ophthal., Supp. 88 (1966)

POLACK, F.M.: Isotopic labeling of corneal stromal cells prior to transplantation.
Transplantation 1, 83 (1963)

REDDY, D.V.N. and V.E. KINSEY:
Composition of vitreous humour in relation to that of plasma and aqueous humour.
Arch. Ophthal. 63, 715 (1960)

REIM, M., F. SCHMIDT und D. MEYER:
Die Metabolite des Energie liefernden Stoffwechsels im Hornhautepithel verschiedener Säugetiere.
Ber. über die 67. Zusammenkunft der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft Heidelberg,
Verlag J.F. Bergmann, München, 1965

REIM, M. und H. LICHTE:
Beziehungen zwischen Energiestoffwechsel und Hornhauttrübung.
Graef.Arch.klin.exp.Ophthal. 168, 365 (1965)

REIM, M.:
Untersuchungen über Enzymaktivitäten und Metabolitgehalte des energieliefernden Stoffwechsels in der Hornhaut.
Habil.Schrift, Marburg 1966

REIM, M., D. MEYER, R. TURSS:
Some observations on the relation between the energy-producing metabolism and the transparency of the cornea.
Proc.Sym. on Biochemistry,
S. Karger, Basel, S. 68 (1966)

REIM, M., F. LAX, H. LICHTE, R. TURSS:
Steady state levels of glucose in the different layers of the cornea, aqueous humour, blood and tears in vivo.
Ophthalmologica 154, 39 (1967)

REIM, M., D. MEYER und H. CATTEPOEL:
Über die Bedeutung des Frierstopverfahrens für den in vivo Status der Metabolite im Corneaepithel.
Graef.Arch.klin.exp.Ophthal. 174, 97 (1967)

REIM, M. und F. SCHMIDT:
Biochemische Veränderungen bei der Vereisung der Hornhaut in vivo.
Ein Beitrag zur Kältetherapie.
Klin.Mbl.Augenheilk. 150, 96 (1967)

REIM, M., H. CATTEPOEL, K. BITTMANN und H. KILP:
Methodische und physiologische Aspekte bei der statistischen Auswertung von Metabolitspiegeln in verschiedenen Kompartimenten der vorderen Augenabschnitte.
Graef.Arch.klin.exp. Ophthal. 177, 355 (1969)

REIM, M., K. BITTMANN und H. KILP:
Die Untersuchung von Metabolitspiegeln im Kammerwasser, im Glaskörper, in der Hornhaut und in der Bindehaut unter verschiedenen experimentellen Bedingungen, und die Auswertung der Ergebnisse mit einem einfachen Computerprogramm.
Documenta Ophthal. 27, 137 (1969)

REIM, M., U. LIPP und G. VENSKE:
Biochemical changes in the cornea after cryotherapy.
World Congress of Ophthal., Mexico City 197o

REIM, M., H. BOECK, A. KRUG und G. VENSKE:
Aqueous humour and cornea stroma metabolite levels under various conditions.
Congress of AEO, Uppsala 1971

RILEY, M.V.: Glucose and oxygen utilization by the rabbit cornea.
Exp. Eye Res. 8, 193 (1969)

RILEY, M.V.: Aerobic glycolysis in the ox cornea.
Exp. Eye Res. 8, 2o1 (1969)

ROHEN, J.W.: Das Auge und seine Hilfsorgane. Handb. mikroskop. Anatomie Bd. III-4
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1964

SALLMANN, L.von, D.H. MOORE:
Electrophoretic patterns of concentrated aqueous humour of rabbit, cattle and horse.
Arch. Ophthal. N.Y. 4o, 279 (1948)

SCHMIDT, F.: Der Metabolitgehalt von Epithel und Stroma der Kaninchencornea und seine Veränderung unter verschiedenen experimentellen Bedingungen.
Inaugural Dissertation, Marburg 1967

SCHWARZ, W.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Aufbau der Sklera und der Cornea des Menschen.
Z. Zellforsch. 38, 26 (1953)

SMELSER, G.K.: The structure of the eye.
Academic Press New York - London, 1961

SÖLLNER, F. und O. HOCKWIN: Über den Gehalt frischer und konservierter Hornhäute an säurelöslichen Phosphatverbindungen (Nucleotiden).
Graef.Arch.Ophthal. 167, 15o (1964)

SÖLLNER, F., W. LICHT, E. NOLL und O. HOCKWIN: Glucosegehalt konservierter Hornhäute.
Graef.Arch.Ophthal. 171, 324 (1967)

SOMMERVILLE, G.M. und M. SHEA: Effect of freezing on the corneal endothelium.
Canad. J. Ophthal. 1, 183 (1966)

STANLEY, J.H., S. MISHIMA, St.D. KLYCE jun.: Water permeability of the rabbit cornea endothelium in vivo.
Invest. Ophthal. 5, 371 (1966)

STAUBESAND, J.: Verh.anat.Ges. 57. Vers. Hamburg
Anat.Anz.Suppl. III, 393 (1962)

STRAUB, W.: Über die Anwendungsmöglichkeit der Kälte in der Ophthalmologie.
Klin.Mbl.Augenheilk. 144, 251 (1964)

STRAUB, W.: Kälteschäden und Kältetherapie des Auges.
Klin.Mbl.Augenheilk. 147, 167 (1965)

TANAKA, N.: Electron microscopy study on refrigerated cornea.
Acta Soc. Ophthal. Jap. 67, 685 (1963)

TENG, G.C.: The fine structure of the corneal epithelium and basement membrane of the rabbit.
Amer. J. Ophthal. 51, 278 (1961)

TOST, M., H. FUHRMEISTER und F. SCHULZE: Experimenteller Beitrag zur Kälteeinwirkung am Auge.
Klin.Mbl.Augenheilk. 146, 1 (1965)

VIRCHOW, H.: Mikroskopische Anatomie der äußeren Augenhaut und des Lidapparates.
In: Handbuch der gesamten Augenheilkunde, 2. Aufl., Bd. I,
hrsg. v. Th. Saemisch, W. Engelmann, Leipzig 1910

WARBURG, O.: Z. Enzymforschung 7, 210 (1938)

WARBURG, O.: Wasserstoffübertragende Fermente.
Cantor GmbH, Freiburg i.B. 1, 1949

Herrn Oberarzt Prof. Dr. med. M. Reim danke ich für die Themenstellung sowie für die großzügige Anleitung und Unterstützung bei der praktischen und theoretischen Arbeit.
Ferner gilt mein Dank der biologisch-technischen Assistentin, Frau H. Cattepoel, für ihre Hilfe bei der Ausführung der Versuche.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

In Frankfurt/Main:

Czerny, Dänzer, Degenhardt, Egle, Frick, Greven, Hanke, Heinz, Kretschmann, Lindauer, Müller, Müser, Ried, Róka, Rosenstock, Royen, Schneider, Schroeder, Seubert, Starck, Vossius, Wezler, Wieland.

In Marburg/Lahn:

Beckmann, Berendes, Bommer, Buchholz, Dittrich, Dölle, Exner, Friedrich, Graul, Hamelmann, Hardewig, Hess, Heuser, Hildebrandt, Hort, Hupe, Jacob, Koransky, Korb, Kreutz, Linneweh, Lütcke, Mann, Martini, Pots, Rodeck, Rodenhäuser, Rohen, Schleyer, Schmid, Schmitz-Moormann, Seidel, Siegert, Straub, Strohmeyer, Voss.

L e b e n s l a u f

Am 31. Oktober 1946 wurde ich als Tochter des Tierarztes Dr.med.vet. Wolfgang Venske und seiner Ehefrau Eva-Maria, geb. Schroth, in Beelen/Westfalen geboren.
Nach dem Besuch der Volksschule in Gießen von 1953 bis 1957 trat ich in die Ricarda Huch-Schule, Gymnasium für Mädchen, in Gießen ein. Im Jahre 196o wechselte ich zur Grimmelshausenschule, Gymnasium in Gelnhausen, wo ich am 17.2.1966 die Reifeprüfung ablegte.
Im Sommersemester 1966 begann ich mein Medizinstudium an der Goethe-Universität in Frankfurt/Main. Dort legte ich am 31.3.1967 die naturwissenschaftliche und am 1.1o.1968 die ärztliche Vorprüfung ab. Seit dem Wintersemester 1968/69 studierte ich an der Philipps-Universität in Marburg/Lahn, wo ich im Sommer 1972 mein medizinisches Staatsexamen ablegte.